

**Untersuchungen zum genetischen Polymorphismus
der humanen Biotransformationsenzyme
Glutathion-S-Transferase T1-1
und
Arylamin-N-Acetyltransferase 1**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Diplom-Pharmazeutin Claudia Bruhn
geboren am 9. März 1966 in Freiberg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Bernhard Ronacher

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. H.-H. Borchert
2. Prof. Dr. med. J. Brockmüller
3. Prof. Dr. rer. nat. M. Melzig

eingereicht: 11. Oktober 2000

Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 2001

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Glutathion-S-Transferasen	3
2.1.1	Allgemeine Struktur und Nomenklatur der Glutathion-S-Transferasen	3
2.1.2	Reaktionen und Substrate der Glutathion-S-Transferasen	6
	GSH-Konjugation	6
	Reduktion	9
	Nichtkatalytische Bindungs- und Transportfunktion	9
	Substrate	9
2.1.3	Inhibitoren der Glutathion-S-Transferasen mit Bedeutung für die Modulation der Zytostatikaresistenz	11
2.1.4	Erkenntnisstand zu Glutathion-S-Transferasen der Klasse Theta	13
	RNA-, DNA- und Proteinebene	13
	Substrate	15
	Bedeutung von Dichlormethan	16
	Der genetische Polymorphismus der Glutathion-S-Transferase Theta 1-1	17
	Pathophysiologische und toxikologische Bedeutung des genetischen Polymorphismus der Glutathion-S-Transferase Theta 1-1	20
2.2	Arylamin-N-Acetyltransferasen	27
2.2.1	Allgemeine Struktur und Nomenklatur der Arylamin-N-Acetyltransferasen	27
2.2.2	Reaktionen und Substrate der Arylamin-N-Acetyltransferasen	28
	N-Acetylierung	28
	O-Acetylierung	29
	Intramolekularer N,O-Acetyltransfer	29
	Substrate	29
2.2.3	Erkenntnisstand zur Arylamin-N-Acetyltransferase 1	32
	RNA-, DNA- und Proteinebene	32
	Substrate	33
	Bedeutung von p-Aminobenzoesäure	34
	Der genetische Polymorphismus der Arylamin-N-Acetyltransferase 1	37
	Pathophysiologische und toxikologische Bedeutung des genetischen Polymorphismus der Arylamin-N-Acetyltransferase 1	42
3	Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion	47
3.1	Glutathion-S-Transferase Theta 1-1	47
3.1.1	Genotypisierung der Probanden	47
	Allgemeines	47
	DNA-Extraktion	47

	Polymerase-Kettenreaktion	48
	Agarose-Gelelektrophorese	49
	Genotypisierung der Probanden: Ergebnisse und Diskussion	49
3.1.2	Phänotypisierung der Probanden	51
	Allgemeines	51
	Bestimmung von Formaldehyd	52
	Inkubationsbedingungen	55
	Optimierung der Probenvorbereitung	55
	Optimierung der Enzymmenge	56
	Optimierung der Inkubationszeit	57
	Optimierung der Substratkonzentration	58
	Optimierung der Cosubstrat-Konzentration	60
	Stabilität und Wiederfindungsrate des Formaldehyds	61
	Präzisionskontrollen	62
	Kontrolle der Richtigkeit der Formaldehydbestimmung	64
	Spezifität der Formaldehydbestimmung	64
	Untersuchungen zur Kalibrierfunktion	65
	Qualitätssicherung während der Probenmessungen	69
	Phänotypisierung der Probanden: Ergebnisse und Diskussion	72
3.1.3	Vergleich und Diskussion der Ergebnisse der Geno- und Phänotypisierung der Probanden hinsichtlich der Glutathion-S-Transferase T1-1	81
3.1.4	Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen mit potentiellen Inhibitoren und Substraten der Glutathion-S-Transferase T1-1	86
	Phosphorsäurediester des Glutathions	86
	Tacrin	89
3.2	Arylamin-N-Acetyltransferase 1	93
3.2.1	Genotypisierung der Probanden	93
	Allgemeines	93
	DNA-Extraktion	93
	RFLP-PCR	93
	Agarose-Gelelektrophorese	93
	Genotypisierung der Probanden: Ergebnisse und Diskussion	94
3.2.2	Phänotypisierung der Probanden	97
	Allgemeines	97
	Bestimmung von PABA und NAcPABA	98
	Inkubationsbedingungen	99
	Optimierung der Probenvorbereitung	99
	Optimierung der Enzymmenge	100
	Optimierung der Inkubationszeit	101
	Optimierung der Substratkonzentration	101
	Optimierung der Cosubstratkonzentration	103
	Stabilität und Wiederfindungsrate von PABA und NAcPABA	104
	Präzisionskontrollen	106
	Kontrolle der Richtigkeit der Bestimmung von PABA und NAcPABA	107
	Spezifität der Bestimmung von PABA und NAcPABA	108

	Untersuchungen zur Kalibrierfunktion	108
	Qualitätssicherung während der Probenmessungen	112
	Intraindividuelle versus interindividuelle Variabilität	116
	Phänotypisierung der Probanden: Ergebnisse und Diskussion	116
3.2.3	Vergleich und Diskussion der Ergebnisse der Geno- und Phäno-typisierung der Probanden hinsichtlich der Arylamin- <i>N</i> -Acetyltransferase 1	119
3.2.4	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick.....	131
	Diskussion der Methodik von Genotypisierung und Phänotypisierung	131
	Konsequenzen der genetischen Polymorphismen von GSTT1-1 und NAT1 für die Probanden dieser Studie	131
	Ausblick.....	134
4	Experimenteller Teil.....	136
4.1	Gewinnung des Untersuchungsmaterials.....	136
4.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	136
4.3	Chemikalien	138
4.4	Methoden	139
4.4.1	Genotypisierung hinsichtlich <i>GSTT1</i>	139
	Leukozyten-Isolation.....	139
	DNA-Extraktion	139
	Polymerase-Kettenreaktion	141
	Agarose-Gelelektrophorese.....	141
4.4.2	Genotypisierung hinsichtlich <i>NAT1</i>	143
	Primer	143
	Restriktionsenzyme	144
	Identifizierung der Allele NAT1*3, NAT1*4, NAT1*10 und NAT1*11	145
	Identifizierung der Allele NAT1*14 und NAT1*15.....	150
	Identifizierung der Allele NAT1*17 und NAT1*22.....	151
4.4.3	Phänotypisierung hinsichtlich GSTT1-1.....	152
	Puffer und Lösungen	152
	Inkubationsansätze.....	153
	Kalibrierung.....	154
	Bestimmung des Formaldehyds	154
	Methodenoptimierung und –validierung	155
4.4.4	Phänotypisierung hinsichtlich NAT1	156
	Puffer und Lösungen	156
	Inkubationsansätze.....	157
	Kalibrierung.....	157
	Bestimmung der PABA- und NAcPABA-Konzentrationen.....	158
	Methodenoptimierung und –validierung	158
	Bestimmung des Hämoglobingehalts	159
4.5	Datenverarbeitungsprogramme und statistische Testmethoden	160

5	Zusammenfassung	162
6	Literaturverzeichnis	165
	Danksagung	194
	Lebenslauf	195
	Publikationsliste	196
	Eidesstattliche Erklärung.....	197

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i> , zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GSH	Glutathion
<i>GSTT1</i>	Glutathion-S-Transferase Theta 1 (das Gen)
GSTT1-1	Glutathion-S-Transferase Theta 1 (das Enzym)
Hb	Hämoglobin
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
kb	Kilobasenpaare
K_m	Michaelis-Konstante; gibt die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion an
<i>NAT1</i>	Arylamin- <i>N</i> -Acetyltransferase 1 (das Gen)
NAT1	Arylamin- <i>N</i> -Acetyltransferase 1 (das Enzym)
NAcPABA	<i>p</i> -Acetamidobenzoessäure
n.b.	nicht bestimmt
n.g.	nicht getestet
n.s.	nicht signifikant
OR	<i>odds ratio</i> (Chancenquotient)
PABA	<i>p</i> -Aminobenzoessäure, 4-Aminobenzoessäure (IUPAC)
PABG	<i>p</i> -Aminobenzoylglutamat, 4-Aminobenzoylglutamat
PAS	<i>p</i> -Aminosalicylsäure, 4-Aminosalicylsäure
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PHS	Prostaglandin-H-Synthase
R	<i>range</i> , Spannweite
RNA	Ribonukleinsäure
RT	<i>retention time</i> , Retentionszeit
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMX	Sulfamethoxazol
s, s_{rel}	Standardabweichung, relative ~
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität, 1 U = 1 μ mol/min
VB	Vertrauensbereich
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion

1 Einleitung und Problemstellung

Die Biotransformation von natürlich vorkommenden oder künstlich erzeugten Fremdstoffen (Xenobiotika) im menschlichen Organismus ist ein komplexer, enzymatisch gesteuerter Prozess. Das Ziel besteht in der Regel darin, die Ausscheidungsfähigkeit mehr oder weniger lipophiler Substanzen durch Überführung in hydrophilere Metaboliten zu erhöhen. Dabei kann es entweder zu einer Entgiftung (Detoxifizierung) oder einer metabolischen Aktivierung (Toxifizierung) der betreffenden Substanz kommen.

Die Biotransformationsenzyme können von Enzyminduktion und -inhibition betroffen sein sowie einem genetischen Polymorphismus unterliegen. Unter genetischem Polymorphismus versteht man die Existenz von Mutationen des Genlocus eines monogen vererbten Merkmals, die zu mindestens zwei Phänotypen in der Bevölkerung führen. Keiner dieser Phänotypen zeigt eine Häufigkeit unter einem Prozent (Ford, 1971). Relativ gut untersucht sind z. B. die genetischen Polymorphismen des Cytochrom P450-Isoenzyms CYP2D6 und der Arylamin-*N*-Acetyltransferase 2 (NAT2). Dank der rasanten Weiterentwicklung molekulargenetischer Methoden wurden in jüngster Zeit Mutationen in den Genloci weiterer Biotransformationsenzyme nachgewiesen. In diesen Fällen sind weiterführende Untersuchungen zur Häufigkeit und zu den phänotypischen Konsequenzen solcher Mutationen sowie zu deren pharmakologisch-toxikologischer Relevanz erforderlich. Zu den Enzymen, für die ein diesbezüglicher Informationsbedarf besteht, gehören auch die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehende Glutathion-*S*-Transferase Theta 1-1 (GSTT1-1) und die Arylamin-*N*-Acetyltransferase 1 (NAT1).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst eine umfassende, aktuelle Literaturübersicht zum Stand der Erforschung des genetischen Polymorphismus der genannten Enzyme erstellt werden. Im experimentellen Teil der Arbeit bestand das Ziel darin, eine Gruppe deutscher Probanden - parallel zu einer entsprechenden Analyse des Genotyps - hinsichtlich ihrer GSTT1-1- und NAT1-Aktivität zu charakterisieren. Im einzelnen waren dazu folgende Aufgaben zu bearbeiten:

- Etablierung, Optimierung und Validierung von Verfahren zur Bestimmung der GSTT1-1-Aktivität unter Verwendung von Dichlormethan als Substrat sowie der NAT1-Aktivität mit dem Substrat *p*-Aminobenzoessäure in Blutproben.
- Bestimmung der Aktivitäten von GSTT1-1 und NAT1 in den Blutproben der Probanden und Vergleich der Ergebnisse mit den Befunden der Genotypisierungen.
- Diskussion der Ergebnisse, insbesondere im Hinblick auf die phänotypischen Konsequenzen der Genotypen und im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Studien.

Darüber hinaus sollte die Beeinflussung der Kinetik des durch die GSTT1-1 vermittelten Stoffwechselweges von Dichlormethan *in vitro* durch einige Substanzen untersucht werden. In diese Untersuchungen wurden zum einen zwei Phosphonsäurediester des Glutathions, die sich in Studien mit anderen Glutathion-S-Transferasen als spezifische Inhibitoren herausgestellt hatten, einbezogen. Zum anderen wurde die Beeinflussung der Kinetik von Dichlormethan durch Tacrin, ein Arzneimittel zur Behandlung des Morbus Alzheimer, untersucht. Dahinter steht die Hypothese, dass durch die Vermittlung von GSTT1-1 proteinreaktive, zytotoxische Tacrin-Metaboliten entgiftet werden könnten.

2 Literaturübersicht

2.1 Glutathion-S-Transferasen

2.1.1 Allgemeine Struktur und Nomenklatur der Glutathion-S-Transferasen

Bei den Glutathion-S-Transferasen (GSTs; EC 2.5.1.18) handelt es sich um die in vielen Spezies verbreiteten Produkte einer Supergenfamilie, die beim Menschen in nahezu allen Zellen vorkommen und an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt sind. Es sind dimere Proteine mit einem Molekulargewicht im Bereich 23000 - 27000 Dalton pro Untereinheit, wobei zwei gleiche (homodimeres Enzym) oder zwei verschiedene Untereinheiten (heterodimeres Enzym) kombiniert sein können. Es existiert für jede Untereinheit ein komplettes, unabhängiges aktives Zentrum, bestehend aus einer Bindungsstelle für Glutathion (*G-site*), einer benachbarten hydrophoben Bindungsstelle für das elektrophile Substrat (*H-site*) und einer Liganden-Bindungsstelle (*L-site*). Die *G-site* befindet sich in der *N*-terminalen Domäne der Untereinheit mit α , β -Faltblattstruktur und besteht aus ca. 80 Aminosäuren. Die ca. 150 Aminosäuren umfassende *H-site* ist in der C-terminalen, α -helikalen Domäne der Untereinheit gelegen (Wilce *et al.*, 1995). Die heute bekannten humanen zytosolischen GST-Isoenzyme werden nach ihrer Struktur sowie ihren immunologischen und enzymatischen Eigenschaften in die Klassen Alpha, Mu, Pi, Theta und Zeta eingeteilt. Die ebenfalls löslichen Isoenzyme der Klasse Sigma wurden bisher nur in Tintenfischen nachgewiesen (Harris *et al.*, 1991). Die Isoenzyme einer weiteren Klasse, mit Kappa bezeichnet, liegen in der Rattenleber offenbar mitochondrial gebunden vor. Mit Hilfe von Gendatenbanken wurde ein humanes homologes Enzym nachgewiesen (Pemble *et al.*, 1996). Daneben sind an Membranen des endoplasmatischen Retikulums gebundene, sogenannte mikrosomale GSTs, beschrieben worden, die offenbar keine Sequenzhomologie zu den zytosolischen Formen aufweisen (DeJong *et al.*, 1988). Innerhalb einer Klasse besteht in der Regel eine Homologie der Aminosäuresequenzen der Enzyme von mindestens 70%, zwischen zwei Klassen liegt sie unter 30% (Wilce *et al.*, 1995).

Mannervik *et al.* formulierten 1992 erstmalig einheitliche Nomenklatur-Regeln für humane GSTs. Danach werden die Gene in kursiver, die Proteine in normaler Schreibweise bezeichnet. Die Zugehörigkeit zu einer Klasse wird durch einen Großbuchstaben (z. B. T für Theta) angegeben, die Untereinheiten werden mit arabischen Ziffern bezeichnet (z. B. GSTT1-1). Für die mikrosomalen GSTs werden römische Zahlen verwendet (z. B. mGST-I). Wurden für einen Genort, wie dies beispielsweise bei der GST Mu der Fall ist, verschiedene Allele nachgewiesen, so werden diese durch einen Stern hinter der Genbezeichnung und Großbuchstaben kenntlich gemacht (*GSTM1*A*). Bei der Bezeichnung der entsprechenden Enzyme verwendet man Kleinbuchstaben (GSTM1a-1b). Bei der Bezeichnung des Genotyps werden die beiden Allele durch einen Schrägstrich voneinander getrennt (z. B. *GSTM1*A/B*), bei der Bezeichnung des Phänotyps durch Komma (GSTM1 A,B). Tab. 1 gibt einen Überblick über die bisher beschriebenen humanen GST-Isoenzyme sowie die Lokalisation der entsprechenden Gene.

Tab. 1: Nomenklatur und Einteilung der humanen Glutathion-S-Transferasen (nach Mannervik *et al.*, 1992).

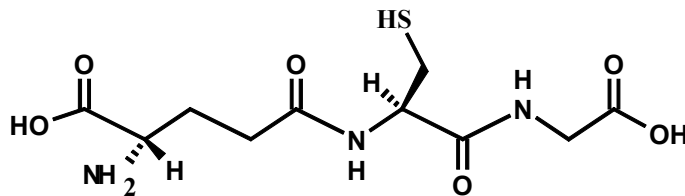
Klasse	Bezeichnung des Gens	Chromosom	Bezeichnung des Isoenzyms	Literatur
Alpha (A)	<i>GSTA1</i>	6p12	GSTA1-1	Board and Webb, 1987 Tu and Qian, 1987
	<i>GSTA2</i>	6p12	GSTA2-2	Stockmann <i>et al.</i> , 1987 Rhoads <i>et al.</i> , 1987
	<i>GSTA3</i>	^a	GSTA3-3	Suzuki <i>et al.</i> , 1993 Board, 1998
	<i>GSTA4</i>	^a	GSTA4-4	Singhal <i>et al.</i> , 1994 Board, 1998
Mu (M)	<i>GSTM1</i>	1p13	GSTM1a-1a	DeJong <i>et al.</i> , 1988a Ross <i>et al.</i> , 1993
			GSTM1b-1b	Seidegard <i>et al.</i> , 1987 Hayes <i>et al.</i> , 1989
			GSTM1a-1b	Widersten <i>et al.</i> , 1991
	<i>GSTM2</i>	1p13	GSTM2-2	Vorachek <i>et al.</i> , 1991 Suzuki <i>et al.</i> , 1987
	<i>GSTM3</i>	1p13	GSTM3-3	Campbell <i>et al.</i> , 1990
	<i>GSTM4</i>	1p13	GSTM4-4	Comstock <i>et al.</i> , 1993 Ross <i>et al.</i> , 1993 Zhong <i>et al.</i> , 1993
	<i>GSTM5</i>	1p13	GSTM5-5	Takahashi <i>et al.</i> , 1993 Pearson <i>et al.</i> , 1993
Pi (P)	<i>GSTP1</i>	11q13	GSTP1-1	Board <i>et al.</i> , 1989 Kano <i>et al.</i> , 1987
Theta (T)	<i>GSTT1</i>	22q11.2	GSTT1-1	Meyer <i>et al.</i> , 1991 Pemble <i>et al.</i> , 1994 Webb <i>et al.</i> , 1996
	<i>GSTT2</i>	22q11.2	GSTT2-2	Hussey and Hayes, 1992 Tan <i>et al.</i> , 1995
Kappa (K)	<i>GSTK1</i>	^a	GSTK1-1	Pemble <i>et al.</i> , 1996
Zeta (Z)	<i>GSTZ1</i>	14q24.3	GSTZ1-1	Board <i>et al.</i> , 1997 Blackburn <i>et al.</i> , 1998
mikrosomale GST	<i>mGST-I</i>	12	mGST-I	Mosialou <i>et al.</i> , 1993
	<i>mGST-II</i>	4q28.31	mGST-II	Jakobsson <i>et al.</i> , 1996
	<i>mGST-III</i>	1q23	mGST-III	Jakobsson <i>et al.</i> , 1997

^a noch nicht beschrieben.

2.1.2 Reaktionen und Substrate der Glutathion-S-Transferasen

GSH-Konjugation

Glutathion-S-Transferasen katalysieren die Konjugation elektrophiler Substrate mit dem Tripeptid γ -Glutamylcysteinylglycine (Glutathion, GSH, **1**).

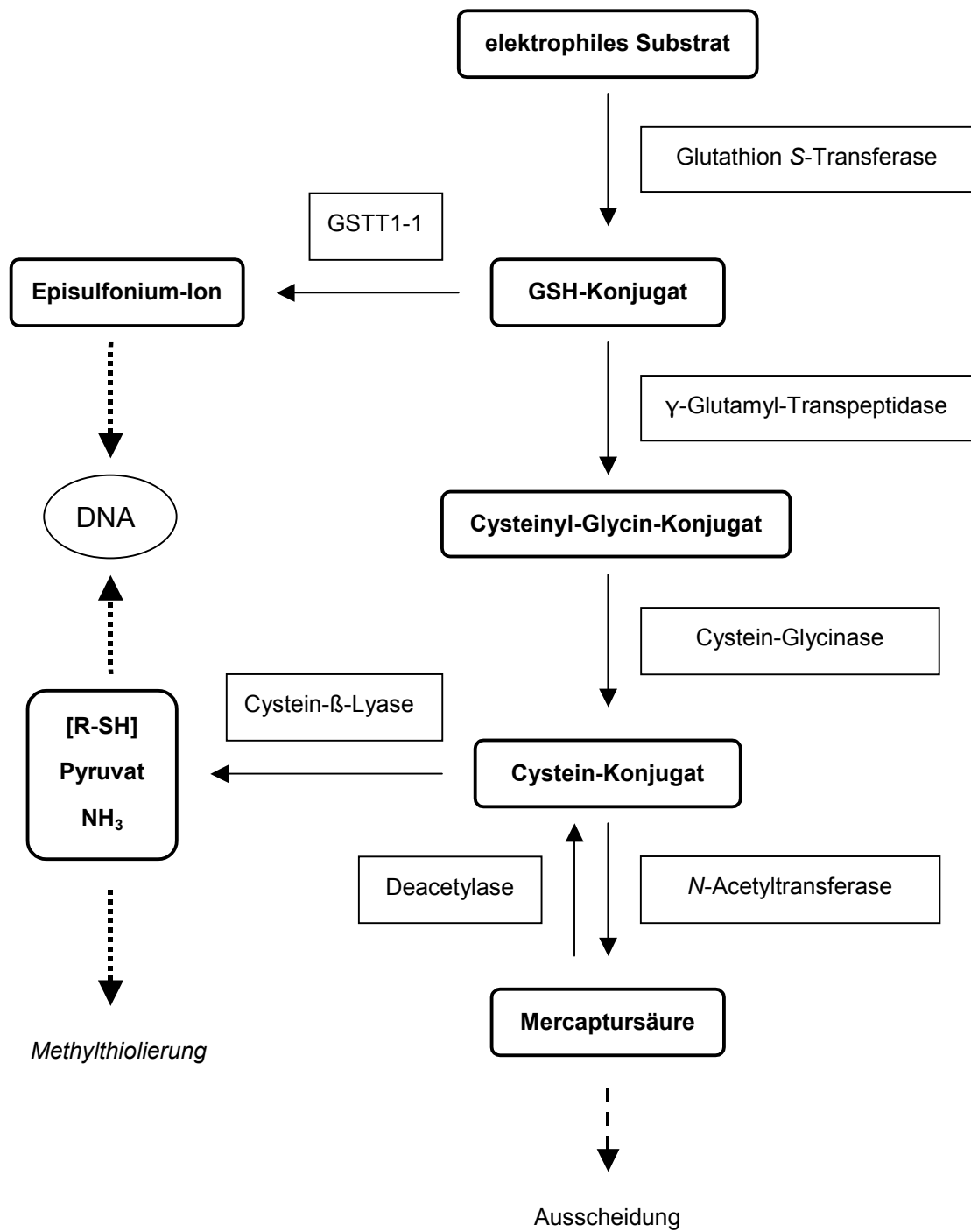


(1)

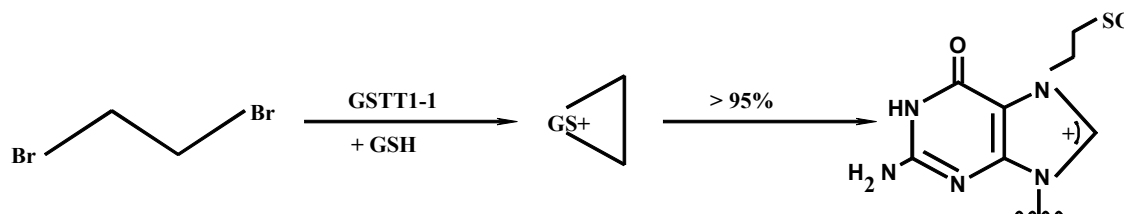
GSH enthält eine nucleophile Thiolgruppe im Cysteinteil, mit der einige elektrophile Substanzen bereits nichtenzymatisch reagieren können, allerdings langsamer als in Gegenwart einer GST (Hallier *et al.*, 1990, Satoh, 1995). Die Thiol-Gruppe des enzymatisch gebundenen Glutathions liegt zum größten Teil ionisiert vor. Für diese Aktivierung zu dem bedeutend nucleophileren Thiolat-Anion wird bei den GSTs der Klasse Alpha ein Arginin-Rest (Arg¹⁵), bei GSTs der Klassen Mu und Pi ein Tyrosin-Rest nahe des *N*-Terminus verantwortlich gemacht. Er liegt bei physiologischem pH partiell dissoziiert vor und kann demzufolge das Proton von der Thiolgruppe übernehmen (Tan *et al.*, 1995). Röntgenstrukturanalysen haben ergeben, dass bei der GST Theta die Funktion der GSH-Aktivierung wahrscheinlich von einem Serin-Rest (Ser¹¹) der GSH-Bindungsstelle übernommen wird (Wilce *et al.*, 1996).

Die entstandenen GSH-Konjugate werden häufig durch γ -Glutamyl-Transpeptidase und Cystein-Glycinase zu Cysteinkonjugaten gespalten und anschließend durch *N*-Acetyltransferasen zu den als Mercaptursäuren bezeichneten *N*-Acetyl-S-Cysteinkonjugaten acetyliert (Schema 1). Diese hydrophilen Verbindungen können über Niere oder Leber ausgeschieden werden. Während o.g. Reaktionsfolge als Entgiftungsweg anzusehen ist, führt die durch Cystein- β -Lyasen katalysierte Biotransformation der Cystein-Konjugate (häufig zu den Phase-III-Reaktionen gerechnet) zu toxisch reaktiven Metaboliten. Ausgehend von den aus GSH-Konjugaten gebildeten Cystein-Konjugaten werden dabei durch

Spaltung der Bindung zwischen dem β -C-Atom des Cysteins und dem S-Atom in der Regel instabile, reaktive Thiolmetaboliten sowie Pyruvat und Ammoniak gebildet. Cystein- β -Lyasen kommen vor allem in der Leber, der Niere und in den Darmbakterien vor. Die Nierentoxizität von polyhalogenierten Alkanen ist beispielsweise durch die Aktivierung über den Cystein- β -Lyase-Weg erklärbar. Dabei erfolgt nach GSH-Konjugation und Mercaptursäure-Bildung in der Leber eine Deacetylierung der Verbindungen. Die entstandenen Cysteinkonjugate werden durch die renale Cystein- β -Lyase zu den elektrophilen Vinylthiolen gespalten, die mit der DNA reagieren. Dieser Weg dürfte u.a. auch für das erhöhte Auftreten von Nierenkarzinomen bei Trichlorethenexposition verantwortlich sein (Brüning *et al.*, 1997). Bei einigen Arzneistoffen (z. B. Carbamazepin, Coffein, Paracetamol, Phenacetin, Propranolol) wird ein Mechanismus der „Methylthiolierung“ diskutiert. Dabei schließt sich an die Spaltung des Cysteinkonjugats durch die Cystein- β -Lyase eine Methylierung der Thiolgruppe an. Für halogenierte Alkane (z. B. Dibromethan) ist die direkte Bildung toxischer Konjugate nachgewiesen worden (van Bladeren *et al.*, 1988). Aus den entsprechenden Glutathion-Konjugaten bilden sich reaktive Episulfonium-Ionen, die an die DNA, bevorzugt in der N7- Position des Guanins, binden können (siehe Schema 2).



Schema 1: Entgiftung und metabolische Aktivierung bei der GST-vermittelten Konjugation elektrophiler Substrate mit GSH.



Schema 2: Metabolische Aktivierung von Dibrommethan durch Bildung eines Episulfonium-Ions über den GSTT1-1-Weg und Bindung an die DNA in N7-Position des Guanins (nach Hengstler *et al.*, 1998).

Reduktion

Viele GST-Isoenzyme besitzen eine Peroxidase-Aktivität. Durch Übertragung von Elektronen aus dem Thiolat-Anion des Glutathions werden die Substrate zu den entsprechenden Alkoholen reduziert. Es sind z. B. Reaktionen mit DNA- und Phospholipid-Hydroperoxiden und 4-Hydroxyalkenalen beschrieben worden (Ketterer and Meyer, 1989, Singhal *et al.*, 1992, 1994). Die 4-Hydroxyalkenale werden als hochtoxische Endprodukte der Lipidperoxidation angesehen (Jensson *et al.*, 1986). Glutathion-S-Transferasen können daher dem durch die Lipidperoxidation vermittelten oxidativen Stress entgegenwirken.

Nichtkatalytische Bindungs- und Transportfunktion

Glutathion-S-Transferasen verfügen über eine als *L-site* bezeichnete Liganden-Bindungsstelle. Diese „nichtkatalytische“ Bindungsregion besitzt eine hohe Affinität zu einer Reihe von hydrophoben Substanzen wie Bilirubin, Häm, Dexamethason und polycyclischen Kohlenwasserstoffen. Aufgrund dieser Eigenschaft wurden die Glutathion-S-Transferasen der Leber als „Ligandin“ bezeichnet, bevor man ihre enzymatische Aktivität entdeckte. Durch die Bindung kann die Toxizität von Substanzen verringert werden (Litwack, *et al.*, 1971, Arias *et al.*, 1976, Jacoby, 1978, Bhargava *et al.*, 1980, Homma *et al.*, 1985).

Substrate

Zu den endogenen Substraten der Glutathion-S-Transferasen zählt man verschiedene Produkte des oxidativen Stoffwechsels (Tab. 2). In vitro Studien belegen eine Beteiligung von GSTs an der Umsetzung von zahlreichen

Arzneistoffen und deren Metaboliten sowie karzinogenen und toxischen Substanzen in Nahrungsmitteln, Pestiziden und aus industriellen Herstellungsprozessen. Tab. 2 zeigt eine Auswahl von Substraten der humanen GSTs der Klassen Alpha, Mu und Pi. Eine Tab. mit spezifischen Substraten von GSTT1-1 ist in Kapitel 2.1.4 enthalten.

Tab. 2: Ausgewählte Substrate der humanen GST-Isoenzyme der Klassen Alpha, Mu und Pi.

Substrat	Bedeutung	Isoenzym	Literatur
Endogene Substanzen			
Leukotrien A ₄	Arachidonsäure-abbau	GSTA, GSTM, GSTP	Söderström <i>et al.</i> , 1985
DNA-Hydroperoxide	Produkte des oxidativen Stoffwechsels	GSTA, GSTM, GSTP	Ketterer and Meyer, 1989
4-Hydroxynonenal		GSTA, GSTM, GSTP	Singhal <i>et al.</i> , 1994
Linolsäure-hydroperoxid		GSTA4	Singhal <i>et al.</i> , 1994
Arzneimittel und -metaboliten			
Acrolein (Propenal)	Spaltprodukt von Zytostatika (z.B. Cyclophosphamid, Ifosfamid)	GSTP1	Berhane <i>et al.</i> , 1994 Dirven <i>et al.</i> , 1995
N-Acetyl- <i>p</i> -benzochinonimin	Paracetamol-Metabolit	GSTA1, GSTA2, GSTP	Ketterer and Taylor, 1990
α-Bromisovaleryl-harnstoff	Hypnotikum	GSTA1, GSTA2, GSTM1, GSTM2	Ketterer and Taylor, 1990
Cyclophosphamid	Zytostatikum	GSTA1	Dirven <i>et al.</i> , 1994
Chlorambucil	Zytostatikum	GSTA1, GSTA2	Ciaccio <i>et al.</i> , 1990, 1991
Ethacrynsäure	Diuretikum	GSTA1, GSTA2, GSTM1, GSTP1	Ploemen <i>et al.</i> , 1993
Ifosfamid	Zytostatikum	GSTP1	Dirven <i>et al.</i> , 1995a
Nitroglycerin	Vasodilatans	GSTA, GSTM	Tsuchida <i>et al.</i> , 1990
Thiotepa	Zytostatikum	GSTA1, GSTP1	Dirven <i>et al.</i> , 1995b
Karzinogene und Toxine			
Aflatoxin B ₁ -8,9-epoxid	Karzinogen	GSTM	Raney <i>et al.</i> , 1992
Benz[a]pyren-4,5-oxid	Karzinogen	GSTM1, GSTP1	Warholm <i>et al.</i> , 1981
DETB ^a	Benz(a)pyren-Metabolit	GSTA,GSTM, GSTP	Robertson <i>et al.</i> , 1986

^a DETB: 7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenz(a)pyren

2.1.3 Inhibitoren der Glutathion-S-Transferasen mit Bedeutung für die Modulation der Zytostatikaresistenz

Ein großes Problem bei der Chemotherapie maligner Erkrankungen ist die Entwicklung von Resistenzen gegen die eingesetzten Arzneistoffe. Die molekularen Mechanismen, die zu einer Resistenz führen, sind heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Auch Glutathion-S-Transferasen sind an der Entstehung von Zytostatika-Resistenzen beteiligt. Folgende Mechanismen wurden bisher erkannt (Waxman, 1990, Ishikawa and Akimaru, 1996):

- Inaktivierung elektrophiler Zytostatika durch direkte Konjugation mit Glutathion (z. B. Cisplatin, Melphalan, Chlorambucil)
- GSH-abhängige Denitrosation von Nitrosoharnstoffen, z. B. BCNU (1,3-bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoharnstoff), und damit verbundene Verringerung der Toxizität der Substanz
- Beseitigung von DNA-Addukten (z. B. Chlorethyl- und Platin-Addukte)
- Reduktion von Peroxiden (z. B. DNA-Hydroperoxide)
- Aktive Elimination von GSH-Konjugaten

An letztgenanntem Mechanismus ist offenbar eine membranständige, ATP-abhängige Efflux-Pumpe (*GS-X pump*) beteiligt, die auch im physiologischen Stoffwechsel eine Rolle beim Transport verschiedener GSH-Konjugate (z. B. Leukotrien C₄) spielt. Es konnte nachgewiesen werden, dass dieses Protein in Cisplatin-resistenten Zellen überexprimiert ist (Ishikawa and Akimaru, 1996). Der Mechanismus ist vergleichbar mit der verstärkten Eliminierung von Zytostatika aus Tumorzellen durch das Membranprotein P-Glykoprotein. Die Überexpression dieses Proteins in Tumorzellen wird für die sogenannte *multidrug-resistance* verantwortlich gemacht (Gottesman and Pastan, 1988, Endicott and Ling, 1989).

In verschiedenen Tumoren sowie Tumorzelllinien wurde eine isoenzymspezifische Überexpression von Glutathion-S-Transferasen nachgewiesen. Beispielsweise sind an der Resistenzentwicklung gegen die alkylierenden Zytostatika Melphalan und Cisplatin GSTs der Klasse Alpha beteiligt, während für die verstärkte Elimination von Doxorubicin und Ifosfamid aus Tumorzellen Klasse-Pi-GSTs

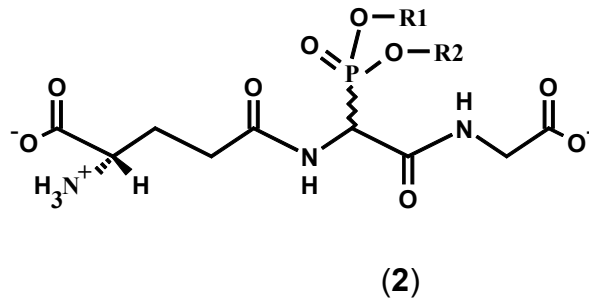
verantwortlich gemacht werden (Waxmann, 1990, Mulders *et al.*, 1995, Dirven *et al.*, 1995). Eine Überexpression von GSTs der Klasse Theta in Tumorzellen ist bisher noch nicht beschrieben worden.

Ein möglicher Ansatz zur Verhinderung der Resistenzentwicklung gegen Zytostatika ist die Modulation der GST-Aktivität bzw. der GSH-Spiegel während der Chemotherapie. Folgende Strategien können angewendet werden:

Verminderung der intrazellulären GSH-Konzentration. Eine starke Verminderung der intrazellulären GSH-Konzentration kann durch Behandlung mit Buthioninsulfoxim, einem irreversiblen Inhibitor des GSH-Biosynthese-Enzyms γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase, erreicht werden. In einer präklinischen Studie wurden damit die GSH-Spiegel in Ovarialtumor-Gewebe bis auf 5 % des ursprünglichen Gehalts verringert, während in anderen Geweben (z. B. Knochenmark) die Reduktion der GSH-Konzentration nur bis auf 20% erfolgte (Ozols *et al.*, 1987).

Hemmung der GST-Aktivität. Bei *in vitro*-Studien mit Tumorzelllinien sowie ersten klinischen Studien wurde versucht, die GST-Aktivität durch Inhibitoren wie beispielsweise Ethacrynsäure, Piriprost und Sulfasalazin zu verringern (Egyhazi *et al.*, 1997, Tew *et al.*, 1988, LaCreta *et al.*, 1994, Gupta *et al.*, 1995). Idealerweise sollten ausschließlich die in den Tumorzellen überexprimierten Isoenzyme gehemmt werden und die Aktivität der übrigen GSTs erhalten bleiben. Die Ergebnisse der bisherigen Studien mit Modulatoren der GST-Aktivität bei der Chemotherapie maligner Erkrankungen sind jedoch noch nicht zufriedenstellend, so dass die Suche nach wirksamen, d.h. isoenzymspezifischen Hemmstoffen fortgesetzt wird. Dabei gibt es prinzipiell zwei verschiedene Wege. Einerseits können diese Inhibitoren durch ein Screening verschiedener Substanzen empirisch gefunden werden. Andererseits ist ein rationaler Ansatz möglich, wobei gezielt von bestimmten Leitstrukturen ausgegangen wird.

Die von Kunze (1996) synthetisierten Substanzen wurden nach einem rationalen Ansatz entwickelt. Es sind Peptidanaloga des Glutathions, die anstelle der CH_2SH -Gruppe im Cysteinteil des Glutathions eine Phosphonsäureester-Gruppierung enthalten (2).



Diese potentiellen Inhibitoren könnten ihre Hemmwirkung durch folgende zwei Mechanismen entfalten:

- Wechselwirkung mit der GSH-Bindungsstelle des Enzyms durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem Tyrosin-Rest des aktiven Zentrums und einem Sauerstoff-Atom der Phosphonsäureester-Gruppierung
- Wechselwirkung mit der hydrophoben Substratbindungsstelle des Enzyms durch die lipophilen Strukturelemente R1 und R2

Kinetische Untersuchungen mit Isoenzymen aus humaner Plazenta und Schweinegeweben ergaben, dass die Phosphono-Analoga des Glutathions bei GST-Isoenzymen der Klasse Alpha eine kompetitive Hemmwirkung und bei Isoenzymen der Klassen Mu und Pi eine überwiegend nicht-kompetitive Hemmwirkung gegenüber Glutathion ausüben können. Somit stellen diese Substanzen potentielle Modulatoren für die Beeinflussung der Zytostatikaresistenz dar (Kunze, 1996).

2.1.4 Erkenntnisstand zu Glutathion-S-Transferasen der Klasse Theta

RNA-, DNA- und Proteinebene

Es wird angenommen, dass die GSTs der Klasse Theta die evolutionären Vorläufer der Klassen Alpha, Mu, Pi und Sigma sind, während die GST Kappa wiederum der Vorläufer von GST Theta sein könnte. Phylogenetische Studien haben das Vorkommen von GST Theta-verwandten Enzymen nicht nur bei Säugern, sondern auch bei Fischen, Pflanzen, Insekten, Hefen, Pilzen und Bakterien nachgewiesen (Pemble *et al.*, 1992). Zwischen der humanen GSTT1-1

und der GST5-5 der Ratte identifizierten Pemble *et al.* (1994) eine Homologie von 82% auf der DNA-Ebene und eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von 80%. Im Gegensatz dazu stimmen die Aminosäuresequenzen der beiden bisher bekannten humanen GSTs der Klasse Theta, GSTT1-1 und GSTT2-2, nur zu 55% überein (Tan *et al.*, 1995).

Die Gene *GSTT1* und *GSTT2* wurden auf Chromosom 22 (22q11.2) mit einem Abstand von etwa 50 kb identifiziert. Sie bestehen aus fünf Exons und einer übereinstimmenden Exon-Intron-Struktur. Die proteinkodierende Region von *GSTT1* umfasst 720 bp, die von *GSTT2* 732 bp (Pemble *et al.*, 1994, Tan *et al.*, 1995). Coggan *et al.* (1998) identifizierten ein *GSTT2*-Genduplikat, das wahrscheinlich ein Pseudogen (*GSTT2P*) darstellt. Mittels *in situ*-Hybridisierung wurde die Verteilung der mRNA von *GSTT1* in Leber- und Lungengewebe untersucht. In der Leber war mit dieser Technik eine gleichmäßige Verteilung der mRNA im gesamten Gewebe sichtbar. In der Lunge konnte die mRNA in den Clara-Zellen und in den Flimmerepithelzellen am Übergang zwischen Bronchiolen und Alveolen detektiert werden (Mainwaring *et al.*, 1996).

Das Genprodukt von *GSTT1* umfasst 239, das von *GSTT2* 244 Aminosäuren (Pemble *et al.*, 1994, Tan *et al.*, 1995). Die Isoenzyme der Klasse Theta unterscheiden sich charakteristisch von denen der anderen GST-Klassen. Sie zeigen keine Aktivität mit dem Standardsubstrat 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (Habig *et al.*, 1981), auch bezüglich der Affinität zu anderen Substraten unterscheiden sie sich grundlegend von anderen GSTs (siehe unten). GST Theta-Isoenzyme lassen sich nicht mittels Affinitätschromatografie an GSH- oder S-hexyl-GSH-haltige Matrices binden. Eine mögliche Ursache dafür besteht darin, dass das aktive Zentrum der GST Theta in einer V-förmigen Tasche des Proteins liegt, die tiefer ist als bei anderen GSTs (Wilce *et al.*, 1996). Die Isolierung einer humanen GST der Klasse Theta gelang erstmalig Meyer *et al.* (1991) aus dem Zytosol von Leberzellen. Eine GSTT1-1-Aktivität in Erythrozyten wurde zum ersten Mal von Schröder *et al.* (1992) gefunden. Desweiteren wurde die Aktivität des Isoenzym in Geweben von Lunge, Herz, Niere, Gehirn, Skelettmuskulatur, Dünndarm, Dickdarm, Magen und Milz nachgewiesen (Mainwaring *et al.*, 1996, Juronen *et al.*, 1996, de Bruin *et al.*, 1999). GSTT2-2 wurde erstmalig 1992 von Hussey und

Hayes aus Humanleber isoliert. Eine Induzierbarkeit der humanen GSTT1-1 konnte noch nicht nachgewiesen werden; das homologe Isoenzym der Rattenleber (GSTT5-5) war durch Indol-3-carbinol, Cumarin und Phenobarbital induzierbar (Sherratt *et al.*, 1998).

Substrate

Die Glutathion-S-Transferasen der Klasse Theta besitzen eine Affinität zu halogenierten Kohlenwasserstoffen und Epoxiden, die als Substrate für GSTs anderer Klassen kaum relevant sind. In Tab. 3 sind die mittleren Reaktionsgeschwindigkeiten der Umsetzung einiger spezifischer GSTT1-1-Substrate angegeben. Über spezifische Substrate von GSTT2-2 ist bisher relativ wenig bekannt. Das Enzym besitzt eine Aktivität gegenüber Cumylhydroperoxid, t-Butylhydroperoxid, Menaphtylsulfat und Ethacrynsäure. Im Unterschied zu GSTT1-1 war keine Umsetzung von 1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy)propan nachweisbar. Dichlormethan ist nach bisherigen Erkenntnissen kein Substrat von GSTT2-2 (Tan *et al.*, 1996).

Tab. 3: Mittlere Reaktionsgeschwindigkeiten der Umsetzung spezifischer Substrate der GSTT1-1; Untersuchungsobjekt: humane Erythrozyten.

Substrat	Reaktionsgeschwindigkeit	Literatur
Methylchlorid	2,3 nmol/min·1,5·10 ¹⁰ Erythrozyten	Hallier <i>et al.</i> , 1990
	2,6 nmol/min·1,5·10 ¹⁰ Erythrozyten	Peter <i>et al.</i> , 1989
Methylbromid	19 nmol/min·1,5·10 ¹⁰ Erythrozyten	Hallier <i>et al.</i> , 1990
	21 nmol/min·10 ⁶ Erythrozyten ^a	Thier <i>et al.</i> , 1999a
Methyliodid	4,3 nmol/min·1,5·10 ¹⁰ Erythrozyten	Hallier <i>et al.</i> , 1990
Dichlormethan	180 pmol/min·mg Hb ^a	Hallier <i>et al.</i> , 1994
Ethylendibromid	1,8 pmol/min·mg Protein	Ploemen <i>et al.</i> , 1995
Ethylenoxid	= 30 nmol/min·ml Lysat	Thier <i>et al.</i> , 1999a
Propylenoxid	= 60 nmol/min·ml Lysat	Thier <i>et al.</i> , 1999a
1,2-Epoxy-3-(p-nitro-phenoxy)propan	28 pmol/min·mg Protein	Ploemen <i>et al.</i> , 1995

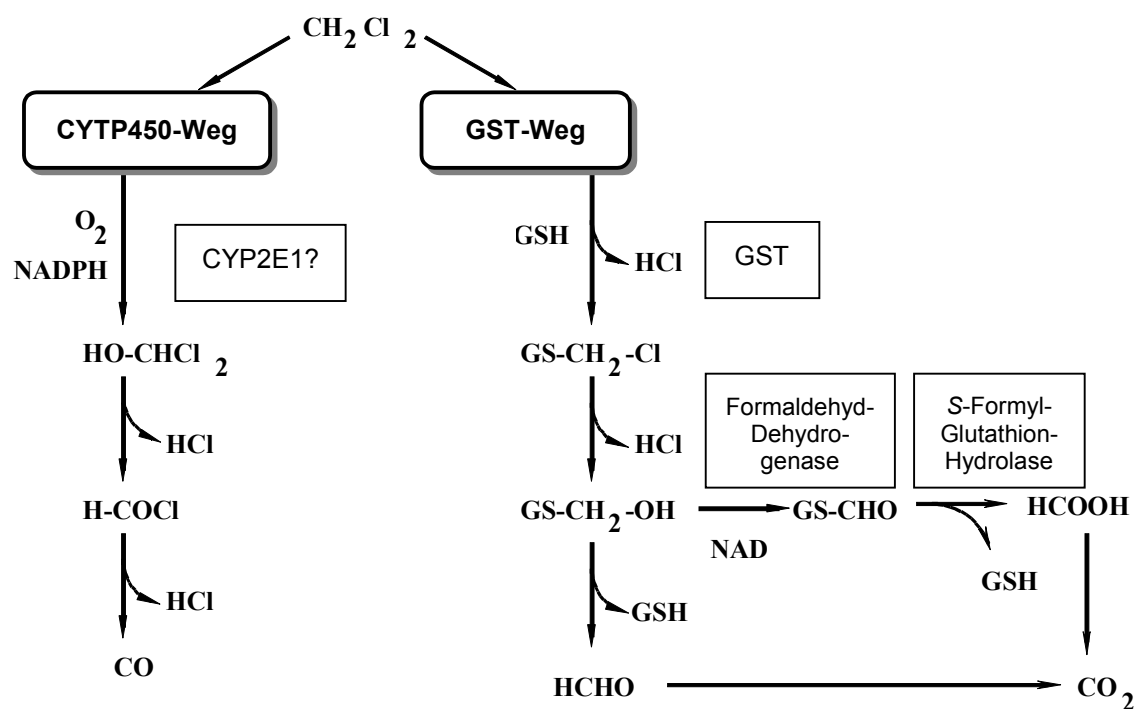
^a V_{max}

Bedeutung von Dichlormethan

Das in der vorliegenden Arbeit als Substrat zur Phänotypisierung der Probanden hinsichtlich GSTT1-1 verwendete Dichlormethan wird in der Farbenindustrie, zur Aerosolherstellung und vor allem als Lösungsmittel breit angewendet. Dichlormethan kann auf zwei Wegen verstoffwechselt werden (siehe Schema 3). Bei der Cytochrom P450-vermittelten Biotransformation wird durch oxidative Dehalogenierung ein Formylchlorid-Zwischenprodukt (HCOCl) gebildet, welches rasch zu Kohlenmonoxid und Chlorid zerfällt. In Untersuchungen mit Rattenlebermikrosomen (Pankow *et al.*, 1994) und perfundierter Rattenleber (Kim *et al.*, 1996) wurde diese Umsetzung überwiegend durch CYP2E1 katalysiert. Beim Biotransformationsweg über GSTT1-1 entsteht zunächst das Konjugat S-Chloromethylglutathion (GSCH_2Cl), welches nichtenzymatisch zum instabilen, nicht isolierbaren Zwischenprodukt S-Hydroxymethylglutathion (GSCH_2OH) hydrolysiert wird. Dieses Hemimercaptal zerfällt zu Formaldehyd und Glutathion. Außerdem wird ein enzymatischer Abbau von S-Chloromethylglutathion über eine NAD-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase und eine S-Formyl-Glutathion-Hydrolase zum Endprodukt Ameisensäure postuliert (Ahmed and Anders, 1978). Diese Hypothese wird gestützt durch den Nachweis erhöhter Ameisensäurespiegel im Urin von Arbeitern nach Dichlormethan-Exposition (Kuzelova and Vlasak, 1966). Die Cytochrom P450-abhängigen mischfunktionellen Oxidasen besitzen eine höhere Affinität zu Dichlormethan als die GSTs, dagegen ist die Kapazität des GST-vermittelten Biotransformationsweges größer (Andersen *et al.*, 1987).

Es wurden verschiedene Studien zur Toxizität und Karzinogenität von Dichlormethan durchgeführt (NTP 1986, Andersen *et al.*, 1987, Graves *et al.*, 1994, Casanova *et al.*, 1997). Beim Menschen konnte die Karzinogenität der Substanz durch epidemiologische Studien noch nicht eindeutig belegt werden (IARC 1986 und 1987). Möglicherweise kommt Dichlormethan selbst aufgrund seiner geringen chemischen Reaktivität nicht als Karzinogen in Frage, sondern nur die bei seiner Biotransformation entstehenden reaktiven Spezies. Dabei scheinen besonders die über den GST-Biotransformationsweg gebildeten Metaboliten S-Chloromethylglutathion und Formaldehyd eine Rolle zu spielen. Bei *in vitro*-

Studien mit Maus- und Rattenleberhepatozyten konnten DNA-Protein-Crosslinking und DNA-Doppelstrangbrüche nach Einwirkung von Dichlormethan nachgewiesen werden. Für DNA-Crosslinking wird der Metabolit Formaldehyd, für die DNA-Doppelstrangbrüche der Metabolit S-Chloromethylglutathion verantwortlich gemacht (Graves *et al.*, 1994). Es wurden außerdem RNA-Formaldehyd-Addukte in Hepatozyten von Mensch, Maus, Ratte und Hamster nachgewiesen (Casanova *et al.*, 1997).



Schema 3: Biotransformation von Dichlormethan (modifiziert nach Andersen *et al.*, 1987).

Der genetische Polymorphismus der Glutathion-S-Transferase Theta 1-1

Historisches. Erste Hinweise auf die mögliche Existenz verschiedener Phänotypen lieferten Untersuchungen von Peter *et al.* (1989). Dabei wurde Methylchlorid - später als spezifisches Substrat von GSTT1-1 erkannt - nur von 60% der Individuen *in vitro* verstoffwechselt. Pemble *et al.* (1994) erbrachten bei der erstmaligen Identifizierung des *GSTT1*-Gens den Nachweis, dass die GSTT1-1-Enzymdefizienz durch eine komplette Deletion des Gens bedingt ist.

Ethnische Unterschiede. Aufgrund dieser Befunde wurden in verschiedenen ethnischen Gruppen Geno- und Phänotypisierungs-Studien durchgeführt, deren Ergebnisse in Tab. 4 - geordnet nach geographischen Gesichtspunkten - zusammengefasst sind. Zwischen den untersuchten europäischen Populationen wurden relativ große Unterschiede in der Häufigkeit der Gendeletion bzw. Enzymdefizienz gefunden (11 - 40%). Die Probandenzahl in den Studien mit deutschen Individuen ist als sehr gering einzuschätzen. Auffällig ist der hohe Anteil des *GSTT1*0/0*-Genotyps in einigen asiatischen Populationen (58 - 64%).

Funktionelle Relevanz des GSTT1-1-Polymorphismus. Zu Beginn der Untersuchungen in vorliegender Arbeit war die Erkenntnis gesichert, dass die GSTT1-1-Enzymdefizienz durch eine komplette Deletion des Gens bedingt ist (Pemble *et al.*, 1994). Die Zahl der Phänotypisierungsstudien hinsichtlich GSTT1-1 war gering (siehe Tab. 4). In einer Studie von Hallier *et al.* (1993) war im Hämolysat von 36 Individuen bei etwa einem Viertel (*high conjugators*) eine deutlich höhere Umsetzungsgeschwindigkeit von Ethylenoxid als bei den übrigen GSTT1-1-aktiven Probanden (*intermediate conjugators*) messbar. Warholm *et al.* (1994) wiesen erstmals in einer größeren Phänotypisierungs-Studie (n = 208) mit Methylchlorid die Existenz dreier Phänotypen nach, wobei der Anteil der enzymdefizienten Individuen bei 11,1% lag; 46,1% waren intermediär und 42,8% hoch aktiv. Die mittlere Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung von Methylchlorid war bei den hoch aktiven Individuen etwa doppelt so groß wie bei den intermediär aktiven.

Tab. 4: Geno- und Phänotypisierungsstudien zur Häufigkeit der *GSTT1*-Gendeletion bzw. *GSTT1*-1-Enzymdefizienz in verschiedenen ethnischen Gruppen.

Ethnische Zugehörigkeit (n)	Art der Untersuchung (Substrat der Phänotypisierung)	Häufigkeit (%) der Gendeletion/ Enzymdefizienz	Literatur
Deutsche (36)	Phänotypisierung (Ethylenoxid)	22	Hallier <i>et al.</i> , 1993
Deutsche (40)	Geno- und Phänotypisierung (Methylchlorid)	15	Kempkes <i>et al.</i> , 1996
Deutsche (45)	Phänotypisierung (Methylchlorid)	40	Peter <i>et al.</i> , 1989
Deutsche/Engländer (16)	Geno- und Phänotypisierung (Methylbromid und Dichlormethan)	38	Pemble <i>et al.</i> , 1994
Schweden (208)	Phänotypisierung (Methylchlorid)	11	Warholm <i>et al.</i> , 1994
Chinesen (187)	Genotypisierung	58	Lee <i>et al.</i> , 1995
Chinesen (45)	Genotypisierung	64	Nelson <i>et al.</i> , 1995
Inder (152)	Genotypisierung	16	Lee <i>et al.</i> , 1995
Koreaner (104)	Genotypisierung	60	Nelson <i>et al.</i> , 1995
Malaysier (167)	Genotypisierung	38	Lee <i>et al.</i> , 1995
Nordamerikaner (185)	Genotypisierung	16	Nelson <i>et al.</i> , 1995
Afroamerikaner (119)		22	
Amerikaner mexikanischen Ursprungs (73)		10	
Nordamerikaner (80)	Genotypisierung	15	Abdel-R. <i>et al.</i> , 1996
Weißer Amerikaner (213)	Genotypisierung	15	Chen <i>et al.</i> , 1996
Afroamerikaner (203)		24	
Brasil. Ureinwohner (130)	Genotypisierung	19	Arruda <i>et al.</i> , 1998
Brasilianer afrikanischen Ursprungs (117)		19	
Amazonas-Indianer (79)		11	
Amerikaner (666)	Genotypisierung	19	Kelsey <i>et al.</i> , 1997a
Weißer Amerikaner (ges.: 1290)	Genotypisierung	16	Li <i>et al.</i> , 2000
Afroamerikaner		26	
Ägypter (34)	Genotypisierung	15	Abdel-R. <i>et al.</i> , 1996
Australier (323)	Genotypisierung	15	Chenevix -Trench <i>et al.</i> , 1995

Pathophysiologische und toxikologische Bedeutung des genetischen Polymorphismus der Glutathion-S-Transferase Theta 1-1

Viele unter Beteiligung von GSTT1-1 verstoffwechselte Substanzen bzw. deren Metaboliten besitzen eine toxische bzw. karzinogene Wirkung auf den menschlichen Organismus. Daraus ergibt sich die Überlegung, dass der *GSTT1*-Genotyp einen prädisponierenden Faktor für maligne Tumorerkrankungen darstellen bzw. die Empfindlichkeit eines Organismus für die Toxizität einer Substanz modulieren könnte. Im folgenden soll ein umfassender Überblick über epidemiologische Studien gegeben werden, die auf Grundlage dieser Überlegungen durchgeführt wurden. Das Prinzip der Untersuchungen bestand darin, die Häufigkeitsverteilung eines angenommenen Risikofaktors in einem Kollektiv von Erkrankten (Fall-Gruppe) mit der in einem Kollektiv gesunder Individuen (Kontroll-Gruppe) zu vergleichen. Als Risikomaß dient der Chancenquotient (*odds ratio*, OR). $OR > 1$ bedeutet, dass das Risiko größer als angenommen ist; $OR < 1$ drückt ein geringeres als das hypothetische Risiko aus. Diese Methode erlaubt die rückwirkende Abschätzung eines Risikos. Angegeben sind jeweils die entsprechenden Vertrauensintervalle (z. B. 95% VB) sowie die Anzahl der Erkrankten und der Kontroll-Individuen in der Form $n = \text{Fälle/Kontrollen}$.

Blasenkrebs. In verschiedenen Studien wurde der Zusammenhang zwischen dem genetischen Polymorphismus von GSTT1-1 und dem Risiko des Auftretens von Blasenkrebs untersucht. In einer Studie von Brockmöller *et al.* (1996) war die Häufigkeit des Auftretens des *GSTT1**A/0- oder *GSTT1**A/A- Genotyps in der Gruppe der Patienten leicht, aber nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht ($n = 365/360$, $OR = 1,2$; 95% VB 0,8 - 1,8). Allerdings bestand in der Untergruppe der Nichtraucher für GSTT1-1-aktive Individuen ein erhöhtes Risiko ($n = 111/81$, $OR = 2,6$; 95% VB 1,1 – 6,0). Dagegen stellen die Ergebnisse einiger anderer Untersuchungen den *GSTT1**0/0-Genotyp als Risikofaktor für die Erkrankung an Blasenkrebs dar. In einer Fall/Kontroll-Studie ($n = 67/248$) von Salagovic *et al.* (1998) war dieses Risiko für Träger des *GSTT1**0/0-Genotyps um das 2,5fache erhöht. In einer Fall/Kontroll-Studie

von Kempkes *et al.* (1996) war im Gegensatz zu den Ergebnissen von Brockmöller *et al.* der Anteil des *GSTT1*0/0*-Genotyps in der Untergruppe der erkrankten Nichtraucher signifikant erhöht ($n = 113/170$, $OR = 3,8$; 95% VB 1,2 – 12,2). Andere Autoren fanden keinen Einfluss des *GSTT1*-1-Polymorphismus auf das Risiko, an Blasenkrebs zu erkranken (Kim *et al.*, 2000, Georgiou *et al.*, 2000).

Dickdarmkrebs. In einer schwedischen Studie war der *GSTT1*0/0*-Genotyp bei den an Dickdarmkrebs Erkrankten signifikant häufiger vertreten als bei den gesunden Kontrollprobanden ($n = 99/109$, Zhang *et al.*, 1999). Dagegen fanden Gertig *et al.* (1998) keinen Zusammenhang zwischen dem *GSTT1*-1-Polymorphismus und dem Risiko, an Dickdarmkrebs zu erkranken ($n = 212/221$, $OR = 0,8$; 95% VB 0,5 – 1,2). Dies trifft auch auf die Ergebnisse einer fallkontrollierten australischen Studie zu ($n = 132/200$, Chenevix-Trench *et al.*, 1995). Allerdings waren der *GSTT1*0/0*-Genotyp bei denjenigen Individuen signifikant häufiger vertreten, bei denen die Krebserkrankung vor dem 70. Lebensjahr auftrat, im Vergleich zu denjenigen mit einer Krebsdiagnose in höherem Lebensalter. Die Autoren postulierten, dass der *GSTT1*-1-Polymorphismus den Zeitpunkt des Auftretens von Dickdarmkrebs beeinflussen kann.

Gehirntumoren. Nach Untersuchungen von Elexpuru-Camiruaga *et al.* (1995) stellt die *GSTT1*-Gendeletion sowohl einen Risikofaktor für die Erkrankung an Astrozytom ($OR = 2,1$; 95% VB 1,3 – 3,4) als auch am Meningiom dar ($OR = 3,6$; 95% VB 1,8 – 6,9).

Hautkrebs. Nach bisherigen Erkenntnissen stellt der *GSTT1*0/0*-Genotyp möglicherweise einen Risikofaktor für Hauterkrankungen dar. In einer Studie von Lear *et al.* (1997) trat bei Patienten mit Basalzellkarzinom nach erfolgreicher Behandlung bei den *GSTT1*0/0*-Individuen ein neuer Primärtumor innerhalb signifikant kürzerer Zeit auf. Kerb *et al.* (1997) fanden bei homozygoten Trägern der *GSTT1*-Gendeletion eine signifikant höhere Empfindlichkeit gegenüber UVB-Bestrahlung ($p = 0,006$). Dies ist erklärbar durch die Fähigkeit von *GSTT1*-1, als Folge von UV-Bestrahlung entstandene DNA- bzw. Lipidperoxide zu entgiften (Ketterer and Meyer, 1989).

Koronare Herzkrankheit (KHK). Epidemiologische Studien haben eindeutig den negativen Einfluss des Rauchens auf Arteriosklerose und Koronare Herzkrankheit bewiesen. Bestandteile des Zigarettenrauches wie Ethylenoxid und monohalogenierte Kohlenwasserstoffe können von GSTT1-1 entgiftet werden. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass Raucher mit dem *GSTT1*0/0*-Genotyp einem größeren Arteriosklerose- und KHK-Risiko ausgesetzt sind. Entgegen dieser Hypothese wurde in einer umfangreichen Studie (n = 1324) von Li *et al.* (2000) gezeigt, dass GSTT1-1-aktive Raucher ein größeres Risiko für eine Erkrankung an KHK besitzen.

Lungenkrebs und andere pneumonale Erkrankungen. In einer Fall/Kontroll-Studie von Kelsey *et al.* (1997a) mit afroamerikanischen (n = 108/132) und mexikanischen (n = 60/146) Individuen trat der *GSTT1*0/0*-Genotyp häufiger in der Gruppe der an Lungenkrebs Erkrankten auf, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. In einer Gruppe von 666 amerikanischen Zimmerleuten gab es keinen Hinweis darauf, dass auf Asbest-Exposition zurückzuführende Lungenerkrankungen in der Gruppe der GSTT1-1-defizienten Individuen häufiger anzutreffen sind (Kelsey *et al.*, 1997b). Zum gleichen Ergebnis kamen Hirvonen *et al.* (1996) bei Untersuchungen in einer Gruppe von 145 Arbeitern, die durch Arbeiten mit asbesthaltigem Isoliermaterial einem großen Asbestose-Risiko ausgesetzt waren.

Morbus Alzheimer und Tacrin. Stroombergen und Waring (1999) stellten fest, dass unter denen von ihnen untersuchten männlichen Individuen diejenigen mit dem *GSTT1*0/0*-Genotyp ein höheres Risiko besaßen, an Parkinson und Morbus Alzheimer zu erkranken. Im Zusammenhang mit letzterer Erkrankung sind auch die Ergebnisse einiger Studien zu Tacrin (9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridin, Cognex[®]), einem Arzneistoff zur Behandlung des Morbus Alzheimer, von Interesse. Die Anwendung von Tacrin führt bei ca. 50% der Patienten zu Leberzellnekrosen. Die Folge ist ein Anstieg der Serum-Alanin-Amino-Transferaseaktivität auf das Drei- bis 20fache der oberen Grenze des Normalbereichs (Watkins *et al.*, 1994, Balson *et al.*, 1995). Die pathogenetische Ursache der Toxizität von Tacrin ist noch nicht endgültig geklärt; die meisten Autoren machen dafür von CYP1A2 gebildete, protein-reaktive Metaboliten

verantwortlich (Madden *et al.*, 1995). Dagegen wurde in Untersuchungen von Naud *et al.* (1997) mit Zellkulturen bereits durch Tacrin selbst eine Hemmung der DNA- und Proteinsynthese beobachtet. Robertson *et al.* (1998) wiesen eine toxische Wirkung von Tacrin auf isolierte Mitochondrien nach. Ebenso ungeklärt ist die Frage, warum nur bei etwa der Hälfte der Patienten o.g. Leberschädigungen auftreten. Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Toxizität von Tacrin und dem Polymorphismus der GST-Isoenzyme Mu und Theta vermutet. In Untersuchungen von Green *et al.* (1995) und Bequemont *et al.* (1997) war die Häufigkeit des *GSTM1*0/0*-Genotyps bei Alzheimer-Patienten mit Tacrin-induzierten Leberschädigungen im Vergleich zu Patienten ohne diese Nebenwirkung nicht signifikant erhöht. In der Studie von Bequemont *et al.* (1997) trat der *GSTT1*0/0*-Genotyp in der Gruppe der Individuen mit Tacrin-induzierten Leberschädigungen im Vergleich zu Patienten ohne diese Nebenwirkung signifikant häufiger auf (OR = 9,2; 95% VB 1,0 – 81,4). Die Kombination *GSTM1*0/GSTT1*0* war in Untersuchungen von Simon *et al.* (2000) mit einer erhöhten Empfindlichkeit für die Hepatotoxizität von Tacrin verbunden (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Überblick über Studien zum möglichen Einfluss des *GSTM1*-1- bzw. *GSTT1*-1-Polymorphismus auf die Hepatotoxizität von Tacrin.

GST-Isoenzym	Tacrin-Hepatotoxizität ^a	n ^b	Literatur
<i>GSTM1</i> -1	kein erhöhtes Risiko bei Patienten mit <i>GSTM1*0/0</i> -Genotyp	33/37 26/26	Green <i>et al.</i> , 1995 Bequemont <i>et al.</i> , 1997
<i>GSTT1</i> -1	erhöhtes Risiko bei Patienten mit <i>GSTT1*0/0</i> -Genotyp (OR = 9,2; 95% VB 1,0 – 81,4)	26/26	Bequemont <i>et al.</i> , 1997
<i>GSTM1</i> -1/ <i>GSTT1</i> -1	signifikant erhöhtes Risiko bei Patienten mit der Kombination der Genotypen <i>GSTM1*0/0</i> und <i>GSTT1*0/0</i>	52/89	Simon <i>et al.</i> , 2000

^aTacrin-induzierte Hepatotoxizität liegt vor, wenn die Serum-Alanin-Aminotransferase-Aktivität mindestens das Dreifache des Normalbereiches beträgt. ^bn = Zahl der Patienten mit/ohne Hepatotoxizität

Myelodysplasie. In einer fallkontrollierten Studie mit Patienten, die an Myelodysplasie litten, lag die Häufigkeit des *GSTT1*0/0*-Genotyps bei den Patienten bei 46%, bei den Kontrollen nur bei 16% (n = 92/190, Chen *et al.*, 1996).

Daraus ergibt sich ein 4,3fach höheres Risiko für Träger dieses Genotyps (95% VB 2,5 – 7,4). Die Autoren einer Studie mit 159 Patienten und 49 Kontrollprobanden japanischer Herkunft (Sasai *et al.*, 1999) konnten diese Befunde bestätigen (OR 2,6; 95% VB 1,3 – 5,5). Preudhomme *et al.* (1997) stellten dagegen keinen Einfluss des *GSTT1*-Genotyps auf das Risiko einer Erkrankung an Myelodysplasie fest (n = 174/100).

Nierenkrebs. Nach Untersuchungen von Brüning *et al.* (1997) stellt der *GSTT1*0/0*-Genotyp ebenso wie *GSTM1*0/0* einen Schutzfaktor gegen die Erkrankung an Nierenkrebs nach jahrelanger Trichlorethylenexposition dar (n = 45/48, OR = 0,24; 95% VB 0,1 - 0,9). Dies ist erklärbar durch die Biotransformation dieser Substanz, bei der katalysiert durch *GSTT1*-1 Dichlorovinyl-S-Cystein gebildet wird (siehe auch Schema 1). Im proximalen Tubulus der Niere erfolgt, katalysiert durch Cystein- β -Lysen, eine weitere Umsetzung zu elektrophilen Thioketenen, den ultimalen genotoxischen Metaboliten.

Mutagenität von *GSTT1*-1-Substraten. Die mutagene Wirkung einer Substanz wird oft durch die Bestimmung der Häufigkeit der Induktion von Schwesterchromatidaustauschen (*sister chromatid exchanges*, SCEs) nachgewiesen. Bei der Bestimmung macht man sich zunutze, dass Chromosomen, die in Bromdeoxyuracil-haltigem Medium kultiviert wurden, nach Giemsa-Färbung eine unterschiedlich starke Anfärbung der beiden Chromatiden zeigen, wodurch SCEs identifiziert werden können. Die SCEs entstehen durch Chromosomenbrüche, die auch in normalen Zellen in geringer Zahl vorhanden sind (basale SCE-Rate). In Gegenwart von Mutagenen ist ihre Rate jedoch oft stark erhöht. Hallier *et al.* (1993) konnten nachweisen, dass die Substanzen Methylbromid, Dichlormethan und Ethylenoxid *in vitro* in den Chromosomen von *GSTT1*-1-defizienten Individuen eine signifikant höhere SCE-Rate verursacht hatten als bei *GSTT1*-1-aktiven Probanden. Müller *et al.* (1998) zeigten, dass Ethylenoxid Addukte mit der N-terminalen Aminosäure des humanen Globins (Hydroxyethylvalin-Addukte, HEV) bilden kann. Die Zahl dieser Addukte war bei Rauchern, die durch den Zigarettenrauch stärker mit Ethylenoxid belastet waren, annähernd fünfmal höher als bei Nichtrauchern. Beim Vergleich von *GSTT1*-1-aktiven und -defizienten Individuen war bei letzteren eine doppelt so große Zahl an

Addukten nachweisbar. In Untersuchungen von Thier *et al.* (1999b) lag die Zahl der HEV bei GSTT1-1-defizienten Individuen um ein Drittel höher als bei GSTT1-1-aktiven Probanden.

Eine akute Methylbromid-Vergiftung hatte bei zwei Arbeitern einer französischen Fabrik unterschiedliche Folgen. Bei dem GSTT1-1-aktiven Arbeiter traten neurotoxische Symptome, bedingt durch den Metaboliten Methanthiol, auf. Der GSTT1-1-defiziente Arbeiter war frei von diesen Symptomen; es war jedoch eine stärkere Bildung von Methylbromid-Globin-Addukten nachweisbar (Garnier *et al.*, 1996).

1,3-Butadien und seine Metaboliten 1,2-Epoxy-3-buten und 1,2,3,4-Diepoxybutan werden als potentielle Mutagene betrachtet. In Untersuchungen zum Einfluss des GSTT1-1-Polymorphismus auf die Mutagenität dieser Substanzen war durch die Aktivität der in *Salmonella typhimurium* exprimierten GSTT1-1 die Mutagenität von 1,2,3,4-Diepoxybutan signifikant erhöht (Thier *et al.*, 1996). Dagegen konnten Norrpa *et al.* (1995), Wiencke *et al.* (1995) und Xu *et al.* (1998) *in vitro* nachweisen, dass die SCE-Raten nach Einwirkung von 1,2,3,4-Diepoxybutan bei GSTT1*0/0-Individuen signifikant höher waren. Sorsa *et al.* (1996) fanden in einer Studie zur Mutagenität von 1,3-Butadien eine doppelt so große Zahl von Chromosomenstrangbrüchen bei Individuen mit dem GSTT*0/0-Genotyp im Vergleich zu Trägern des Gens. Im Gegensatz dazu konnten Kelsey *et al.* (1995) in einer Studie mit 40 Arbeitern, die akut oder chronisch mit 1,3-Butadien exponiert waren, keine signifikant höheren SCE-Raten unter den Individuen mit dem GSTT1*0/0-Genotyp feststellen.

Schröder *et al.* (1995) postulierten, dass GSTT1-1 einen Schutzfaktor gegen die gentoxische Wirkung endogener oder aus dem Zigarettenrauch stammender Substanzen darstellt. 30 Individuen (15 GSTT1-1-aktive, 15 GSTT1-1-defiziente) wurden hinsichtlich ihrer basalen SCE-Rate untersucht. Die GSTT1-1-aktiven Individuen zeigten eine signifikant niedrigere basale SCE-Rate als die GSTT1-1-defizienten Individuen. Außerdem wurde ein Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern festgestellt; bei den GSTT1-1-aktiven Nichtrauchern war eine signifikant niedrigere SCE-Rate als bei den GSTT1-1-aktiven Rauchern und den

GSTT1-1- defizienten Nichtraucher zu beobachten. Die höchste SCE-Rate wurde bei GSTT1-1- defizienten Rauchern nachgewiesen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nach bisherigen Erkenntnissen die *GSTT1*-Gendefizienz einen Risikofaktor für die Erkrankung an Hautkrebs und Gehirntumoren darstellt. Das Vorhandensein des Gens führt wahrscheinlich zu einem höheren KHK-Risiko sowie bei Exposition mit Chemikalien wie Trichlorethylen zu einem erhöhten Nierenkrebs-Risiko. Die Zahl der dazu vorliegenden Studien ist jedoch gering. Die Untersuchungen verschiedener Autoren zum Zusammenhang zwischen dem GSTT1-1-Polymorphismus und dem Risiko einer Erkrankung an Blasen-, Dickdarm- und Lungenkrebs sowie Myelodysplasie erbrachten differenzierte Ergebnisse, so dass noch keine eindeutigen Aussagen getroffen werden können. Auch hinsichtlich der Mutagenität verschiedener GSTT1-1-Substrate lassen die Ergebnisse vorliegender Studien meist noch keine eindeutige Bewertung zu (Tab. 6). Bei der Beurteilung des Einflusses des genetischen Polymorphismus von GSTT1-1 darf der Anteil anderer Enzyme an der Biotransformation der potentiellen Mutagene und eventuell deren genetische Polymorphismen nicht unberücksichtigt bleiben.

Tab. 6: Übersicht zum Erkenntnisstand zur Mutagenität von GSTT1-1-Substraten und zum Einfluss des genetischen Polymorphismus des Enzyms; Quellenangaben im Text.

GSTT1-1-Substrat	Mechanismen	Mutagenitätsrisiko
Methylbromid	SCEs und Globin-Addukte erhöht bei Gendeletion: neurotoxische Symptome bei GSTT1-1-aktiven Individuen	kontrovers diskutiert
Dibromethan	Bildung von Episulfonium-Ionen	erhöht für GSTT1-1-aktive Individuen
Dichlormethan	Giftung über GST-Weg (Formaldehyd, S-Chloromethyl-GSH) SCEs erhöht bei <i>GSTT1*0/0</i>	kontrovers diskutiert
1,3-Butadien und Metaboliten	SCEs bei <i>GSTT1*0/0</i> erhöht, aber nicht in allen Studien	kontrovers diskutiert
Ethylenoxid	SCEs, HEV erhöht bei Gendeletion HEV erhöht bei Rauchern	erhöht bei GSTT1-1-Defizienz und/oder Rauchen; aber: erhöhtes KHK-Risiko bei GSTT1-1-aktiven Rauchern
1,2-Epoxy-3-(<i>p</i> -nitrophenoxy)propan	Entgiftung durch GSTT1-1	erhöht bei GSTT1-1-Defizienz

2.2 Arylamin-*N*-Acetyltransferasen

2.2.1 Allgemeine Struktur und Nomenklatur der Arylamin-*N*-Acetyltransferasen

Die bei zahlreichen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen verbreiteten Arylamin-*N*-Acetyltransferasen (NATs, EC 2.3.1.5) sind Produkte der voneinander unabhängigen Genloci NAT1, NAT2 und NATP1, wobei letzterer ein funktionsloses Protein kodiert (Blum *et al.*, 1990). Gegenwärtig wird intensiv an der Aufklärung der Struktur der aktiven Zentren von NAT1 und NAT2 gearbeitet. Nach Dupret *et al.* (1994) befindet sich das aktive Zentrum der aus 290 Aminosäuren bestehenden NAT1 vermutlich in der Region zwischen den Aminosäuren 47 und 111. Untersuchungen dieser Autoren fanden eine Bedeutung der zentralen Region zwischen den Aminosäuren 112 und 210 für die Affinität von NAT1 zum Substrat *p*-Aminosalicylsäure. Nach Erkenntnissen von Deloménie *et al.* (1997) sind Arg⁹ und Arg⁶⁴ essentiell für Funktion und Stabilität von NAT1 und NAT2. Die vom katalytisch bedeutsamen Cys⁶⁸ relativ weit entfernten Aminosäuren in Position 125, 127 und 129 (Phe¹²⁵, Arg¹²⁷ und Tyr¹²⁹ bei NAT1, Ser¹²⁵, Ser¹²⁷ und Ser¹²⁹ bei NAT2) sind wahrscheinlich ebenfalls Bestandteil der aktiven Zentren von NAT1 und NAT2, da sie in Untersuchungen von Goodfellow *et al.* (2000) von entscheidender Bedeutung für die Substratspezifität der Enzyme waren.

Die ersten einheitlichen Nomenklatur-Regeln für Arylamin-*N*-Acetyltransferasen wurden 1995 von Vatsis *et al.* veröffentlicht und werden seitdem regelmäßig aktualisiert (Hein *et al.*, 2000). Danach bezeichnet man die Gene in kursiver, die Proteine in normaler Schreibweise. Allele werden durch einen Stern (*) hinter der Genbezeichnung und arabische Zahlen sowie gegebenenfalls Großbuchstaben gekennzeichnet (z. B. NAT2*5B). Die Bezeichnung des entsprechenden Proteins enthält keinen Stern, d.h. NAT2*4 kodiert das Protein NAT2 4. Bei der Bezeichnung des Genotyps werden die beiden Allele durch einen Schrägstrich voneinander getrennt (z. B. NAT1*4/*10), bei der Bezeichnung des Phänotyps durch Komma (NAT1 4,10). Traditionell werden die humanen Allele NAT1*4 und NAT2*4 als „Wildtyp-Allele“ bezeichnet. Seit Erstellung dieser allgemeinen Regeln

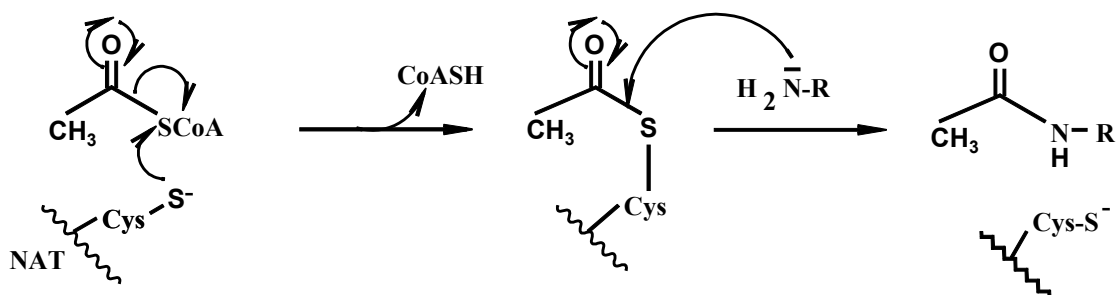
sind bei allen Spezies zahlreiche neue Mutationen in den NAT-Genen entdeckt worden. Die Notwendigkeit der Schaffung einheitlicher Regeln für die Benennung neuentdeckter Allele führte zur Gründung des „Arylamin-*N*-Acetyltransferase-Nomenklatur-Komitee“. Im Internet sind unter der Adresse <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html> aktuelle Listen mit NAT-Allelen aller Spezies abrufbar.

2.2.2 Reaktionen und Substrate der Arylamin-*N*-Acetyltransferasen

N-Acetylierung

Die Acetylierung der NAT-Substrate erfolgt über einen zweistufigen Prozeß, einen sogenannten Ping-Pong-Mechanismus (vgl. Schema 4). Im ersten Schritt acetyliert Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) die SH-Gruppe eines Cysteinyln-Restes in Position 68 (Cys⁶⁸) im aktiven Zentrum der Arylamin-*N*-Acetyltransferase. Die Entstehung eines Thioester-Zwischenprodukts wurde erstmalig mit Taubenleber-NAT nachgewiesen (Andres *et al.*, 1983). Anschließend wird die Acetylgruppe vom Enzym auf die funktionelle Gruppe des Substratmoleküls übertragen.

In Konkurrenz zur *N*-Acetylierung steht die von Cytochrom P450-1A2 (CYP1A2) oder Prostaglandin-H-Synthase (PHS) katalysierte *N*-Oxidation der Arylamine zu Hydroxylaminen. Aus den *N*-Acetamide entstehen auf diesem Weg Hydroxamsäuren (siehe Schema 5). Dies stellt einen Initialisierungsschritt in Richtung metabolischer Aktivierung der Substrate dar. Die Bildung DNA- oder protein-reaktiver Nitrenium-Ionen erfolgt durch NAT-katalysierte *O*-Acetylierung oder intramolekularen *N,O*-Acetyltransfer (siehe unten).



Schema 4: NAT-katalysierte *N*-Acetylierung eines Amins.

O-Acetylierung

Neben der *N*-Acetylierung besitzen NATs die Fähigkeit zur O-Acetylierung. Die O-Acetylierung von *N*-Hydroxy-Gruppen, beispielsweise bei den potentiellen Karzinogenen *N*-Hydroxy-2-aminofluoren oder *N*-Hydroxy-4-aminobiphenyl (Hein *et al.*, 1993, Badawi *et al.*, 1995, Thompson *et al.*, 1999) führt zu instabilen *N*-Acetoxy-arylamino-Zwischenprodukten, die zu DNA- oder protein-reaktiven Nitrenium-Ionen zerfallen (vgl. Schema 5).

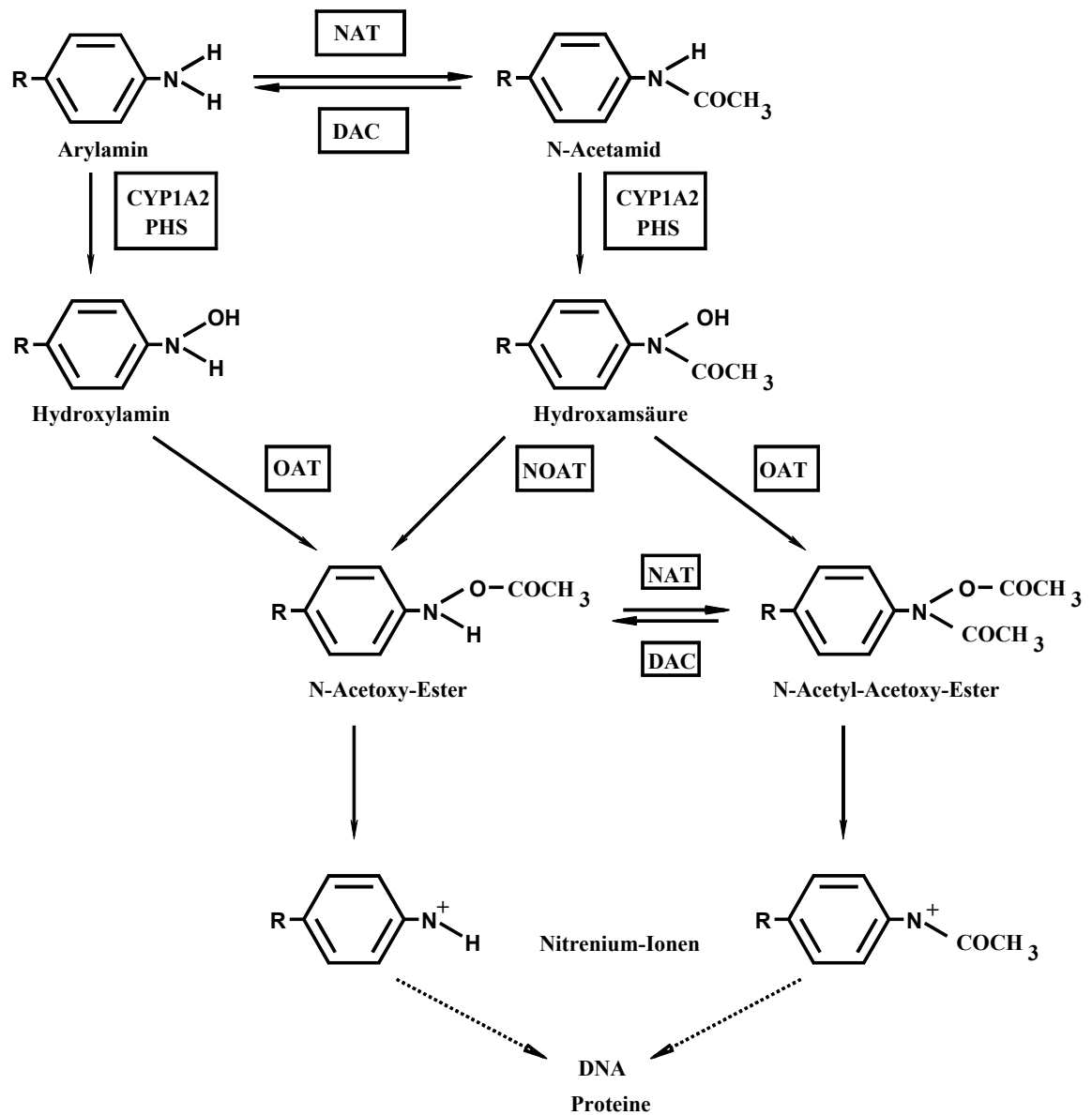
Intramolekularer N,O-Acetyltransfer

Diese instabilen Zwischenprodukte können auch durch NAT-katalysierten intramolekularen *N,O*-Acetyltransfer, beispielsweise bei *N*-Hydroxy-*N*-acetyl-arylaminen (Hydroxamsäuren) gebildet werden (vgl. Schema 5). Dies wurde mit rekombinanter humaner NAT1 und NAT2 (exprimiert in *E. coli*) für *N*-Hydroxy-2-acetyl-aminofluoren und *N*-Hydroxy-4-acetyl-aminobiphenyl nachgewiesen (Hein *et al.*, 1993).

Substrate

Substrate der Arylamin-*N*-Acetyltransferasen sind Substanzen mit primären Aminogruppen wie primäre aromatische oder seltener aliphatische Amine (z. B. Cilastatin), Sulfanilamide, Hydrazine (z. B. Hydralazin), Hydrazide (z. B. Isoniazid) und Aminosäuren. Die Acetylierung des Antidepressivums Viloxacin, das außerdem mit Hippursäure konjugiert wird, ist ein Beispiel für die seltene Acetylierung eines sekundären Amins (Pfeifer *et al.*, 1995). Aufgrund dieser Strukturmerkmale zählen zu den NAT-Substraten Arzneimittel und deren Metaboliten, Nahrungsmittelbestandteile, und deren nicht zuletzt vom Menschen selbst erzeugte Umweltgifte (Tab. 7). NAT1 und NAT2 besitzen eine überlappende Substratspezifität. In Untersuchungen von Hein *et al.* (1993) mit humaner, in *E. coli* exprimierter NAT1 und NAT2 wurde die *N*-Acetylierung und damit Entgiftung von Karzinogenen wie 4-Aminobiphenyl, 2-Aminofluoren, Glu-P2, IQ, MeIQ, MeIQx und β -Naphthylamin sowohl von NAT1 als auch NAT2 katalysiert (Tab. 7). Die metabolische Aktivierung von *N*-Hydroxy-arylaminen wie *N*-Hydroxy-2-aminofluoren und *N*-Hydroxy-4-aminobiphenyl via O-Acetylierung bzw. der

N,O-Acetyltransfer bei *N*-Hydroxy-*N*-acetyl-arylaminen wie *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluoren und *N*-Hydroxy-4-acetylaminobiphenyl wurden in dieser Studie überwiegend von NAT1 katalysiert.



Schema 5: Entgiftung und metabolische Aktivierung von Arylaminen (modifiziert nach Hein *et al.*, 1993 und Grant *et al.*, 1997). DAC: Deacetylierung; OAT: NAT-katalysierte O-Acetylierung; NOAT: NAT-katalysierter intramolekularer *N,O*-Acetyltransfer.

Tab. 7: Ausgewählte Substrate der humanen Arylamin-*N*-Acetyltransferasen NAT1 und NAT2.

Substrat	Bedeutung	Enzym	Literatur
<i>Arzneimittel und-metaboliten</i>			
<i>p</i> -Amino-salicylsäure	Reserve-Tuberkulostatikum	NAT1	Grant <i>et al.</i> , 1991, 1993 Hein <i>et al.</i> , 1993
Amrinon	Behandlung der Herzinsuffizienz	NAT2	Evans, 1992
Batracylin ^a	potentielles Zytostatikum	überwiegend NAT2	Stevens <i>et al.</i> , 1999
Dapson	Lepra-Chemotherapeutikum	NAT1 und NAT2	Evans, 1992 Palamanda <i>et al.</i> , 1995
Procainamid	Antiarrhythmikum	NAT1 und NAT2	Grant <i>et al.</i> , 1991 Hein <i>et al.</i> , 1993
Sulfamethazin	Sulfonamid	überwiegend NAT2	Grant <i>et al.</i> , 1991 Hein <i>et al.</i> , 1993
Sulfamethoxazol	Sulfonamid	überwiegend NAT1	Cribb <i>et al.</i> , 1993
<i>Nahrungsmittelbestandteile</i>			
Glu-P2 ^b MeIQ, MeIQx ^c	Karzinogene Nebenprodukte beim Kochen von Fleisch und Fisch	NAT1 und NAT2	Hein <i>et al.</i> , 1993
<i>Karzinogene, Toxine, Allergene und weitere Substanzen</i>			
PABA	ausführlich siehe 2.2.3	NAT1	Ohsako/Deguchi, 1990
4-Aminobiphenyl	Karzinogen (z. B. im Zigarettenrauch)	NAT1 und NAT2	Hein <i>et al.</i> , 1993 Badawi <i>et al.</i> , 1995 Culp <i>et al.</i> , 1997
2-Aminofluoren	Karzinogen	NAT1 und NAT2	Grant <i>et al.</i> , 1991 Hein <i>et al.</i> , 1993, 1994
Benzidin und -metaboliten	Redoxindikator Farbenherstellung	NAT1 und NAT2	Zenser <i>et al.</i> , 1996
IQ ^d	Karzinogen (z. B. im Zigarettenrauch)	NAT1 und NAT2	Hein <i>et al.</i> , 1993
β-Naphtylamin	Karzinogen (z. B. im Zigarettenrauch)	NAT1 und NAT2	Hein <i>et al.</i> , 1993
PhIP ^e	Karzinogen in gekochtem Fleisch und Zigarettenrauch	NAT1	Sadrieh <i>et al.</i> , 1996
PPD ^f	Allergen	NAT1	Kawakubo <i>et al.</i> , 2000
<i>o</i> -, <i>p</i> -Toluidin	Farbenherstellung	NAT1 und NAT2	Hein <i>et al.</i> , 1993

^aBatracylin: 8-Aminoisindolo[1,2-*b*]chinazolin-12(10H)-on; ^bGlu-P-2: 2-Aminodipyrido[1,2-*a*:3'2'*d*]imidazol;

^cMeIQ: 2-Amino-3,4-dimethyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]chinolin; MeIQx: 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]chinoxalin;

^dIQ: 2-Amino-3-methyl-imidazo[4,5-*f*]chinolin; ^e PhIP: 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin; ^f PPD: *p*-Phenylendiamin, (1,4-Diaminobenzen)dihydro-chlorid.

2.2.3 Erkenntnisstand zur Arylamin-*N*-Acetyltransferase 1

RNA-, DNA- und Proteinebene

Homologe Enzyme der humanen Arylamin-*N*-Acetyltransferase 1 sind bei zahlreichen Säugetieren (Ratte, Maus, Kaninchen, Hamster, Wild- und Hauskatze), Vögeln (Huhn) und Bakterien (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis* und *M. tuberculosis*) nachgewiesen worden (Übersicht in <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>). Dabei wurden Homologien der Aminosäuresequenzen zur humanen NAT1 von 50% (Huhn) bis zu 75% (Kaninchen) gefunden (Vatsis *et al.*, 1995). In Hunden ist keines der beiden *NAT*-Gene vorhanden (Trepanier *et al.*, 1997).

Der Genlocus der humanen NAT1 befindet sich wie auch der von NAT2 auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 (Region 8p 21.3-23.1, Hickmann *et al.*, 1994), jedoch mindestens 25 kb davon entfernt. *NAT1* und *NAT2* besitzen einen intronfreien, offenen Leserahmen von 870 bp; ihre Nukleotidsequenz stimmt zu etwa 87% überein. Sie kodieren aus 290 Aminosäuren bestehende Proteine mit einer Identität von 81%. Die proteinkodierende Region von *NAT1* befindet sich auf einem einzelnen Exon. NAT1 und NAT2 werden unabhängig voneinander exprimiert (Grant, 1993).

NAT1-mRNA wurde mittels *in situ*-Hybridisierung in der Leber, im Verdauungstrakt (Speiseröhre, Magen, Dünndarm, Dickdarm), in Harnleiter, Blase und Lunge (Windmill *et al.*, 2000) und mittels RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) in Humanhaut und humanen Keratinozyten identifiziert (Kawakubo *et al.*, 2000).

Die Aktivität des Enzyms wurde bisher in Zellen von Leber, Darm, Pankreas, Plazenta, Blase und Kehlkopf nachgewiesen (Grant *et al.*, 1991, Rodriguez *et al.*, 1993, Hickmann *et al.*, 1998, Anderson *et al.*, 1997, Smelt *et al.*, 1998, Badawi *et al.*, 1995, Stern *et al.*, 1993). Im Blut fand man eine NAT1-Aktivität in Leukozyten und Erythrozyten, wobei die Aktivität in Erythrozyten 99% der Gesamtaktivität beträgt (Cribb *et al.*, 1991, Ward *et al.*, 1992, Risch *et al.*, 1996).

Substrate

Während NAT1 bereits im fetalen und neonatalen Stoffwechsel nachweisbar ist, tritt NAT2 nicht vor Vollendung des ersten Lebensjahres auf (Minchin, 1995). Aufgrund dieser Befunde wird vermutet, dass NAT1 neben der Verstoffwechslung von Xenobiotika noch weitere Funktionen besitzt. Als einziges potentiell endogenes Substrat wurde bisher *p*-Aminobenzoylglutamat (PABG) identifiziert. PABG entsteht aus Folsäure durch Spaltung der C₉-N₁₀-Bindung und wird weiter zu *N*-Acetyl-PABG *N*-acetyliert. *N*-Acetyl-PABG gilt als der Hauptmetabolit und ist im Urin nachweisbar. Die Beteiligung von NAT1 an der Acetylierung von PABG wurde in der Monozyten-Zelllinie U937 (Minchin, 1995) und in humanen Keratinozyten (Kawakubo und Ohkido, 1998) nachgewiesen.

Unter den NAT-Substraten in Tab. 7 finden sich nur wenige, deren Umsetzung fast ausschließlich von NAT1 katalysiert wird. Einige davon werden zur Phänotypisierung von Probanden hinsichtlich dieses Enzyms verwendet. In Tab. 8 sind Literaturangaben zu den mittleren Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Umsetzung von *p*-Aminobenzoessäure (PABA), *p*-Aminosalicylsäure (PAS) und Sulfamethoxazol (SMX) in verschiedenen Untersuchungsobjekten zusammengestellt.

Tab. 8: Mittlere Reaktionsgeschwindigkeiten der Umsetzung spezifischer NAT1-Substrate.

Substrat	Untersuchungs- objekt	Reaktionsgeschwindigkeit	Literatur
<i>p</i> -Amino- benzoesäure	Blasenschleimhaut -Zytosol	2,9 nmol NAcPABA/min·mg Protein	Badawi <i>et al.</i> , 1995
	Humanleber- Zytosol	13,9 nmol NAcPABA/min·mg Protein ¹	Grant <i>et al.</i> , 1991
	humanes Erythrozytenlysats	0,2 mmol NAcPABA/min·mmol Hb	Ward <i>et al.</i> , 1992
	humane Leukozyten	6,3 nmol NAcPABA/min·mg Protein ^a	Cribb <i>et al.</i> , 1995
	rekomb. Enzym (COS-1-Zellen)	1,2 nmol NAcPABA/min·U ^a	Grant <i>et al.</i> , 1991
	rekomb. Enzym (<i>E. coli</i>)	2,3 µmol NAcPABA/min·U	Hein <i>et al.</i> , 1993
<i>p</i> -Amino- salicylsäure	Humanleber- Zytosol	14,8 nmol NAcPAS/min·mg Protein ^a	Grant <i>et al.</i> , 1991
	rekomb. Enzym (COS-1-Zellen)	1,3 nmol NAcPAS/min·U ^a	Grant <i>et al.</i> , 1991
	rekomb. Enzym (<i>E. coli</i>)	1,1 µmol NAcPAS/min·U	Hein <i>et al.</i> , 1993
Sulfamethoxazol	Humanleber- Zytosol	0,2 nmol NAcSMX/min·mg Protein ^a	Cribb <i>et al.</i> , 1993
	humane Leukozyten	0,2 nmol NAcSMX/min·mg Protein ^a	Cribb <i>et al.</i> , 1995
	rekomb. Enzym (<i>E. coli</i>)	489 nmol NAcSMX/min·mg Protein ^a	Cribb <i>et al.</i> , 1993

^a V_{max}**Bedeutung von *p*-Aminobenzoessäure**

PABA im Folsäurestoffwechsel. Folsäure kann von Mikroorganismen, jedoch nicht vom Menschen synthetisiert werden. Im Dickdarm ist *E. coli* in der Lage, Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat über das Zwischenprodukt Chorisminsäure in PABA umzuwandeln und daraus Folsäure zu synthetisieren. Welche Mengen Folsäure aus dem Dickdarm aufgenommen werden können, ist nicht genau bekannt (Buddecke, 1994). Sie muss deshalb in ausreichender Menge mit der Nahrung zugeführt werden. Bei der Chemotherapie bakterieller Infektionen mit Sulfonamiden kommt die Folsäuresynthese der Mikroorganismen zum Erliegen, da die Sulfonamide den Einbau von PABA kompetitiv hemmen.

PABA als UVB-Filter. PABA wird in Kosmetika als UVB-Filter verwendet. Laut Kosmetikverordnung (BGBl. I S. 1082 vom 26.6.1985, geändert durch die 24. Änderungsverordnung vom 21.12.1995, BGBl. S. 2098) darf die Substanz dabei in einer zulässigen Höchstkonzentration von 5% und das Derivat 4-Bis(polyethoxy)-aminobenzoessäurepolyethoxyethylester in einer Höchstkonzentration von 10% eingesetzt werden. Wegen des Risikos allergischer Reaktionen wird PABA nur eingeschränkt verwendet.

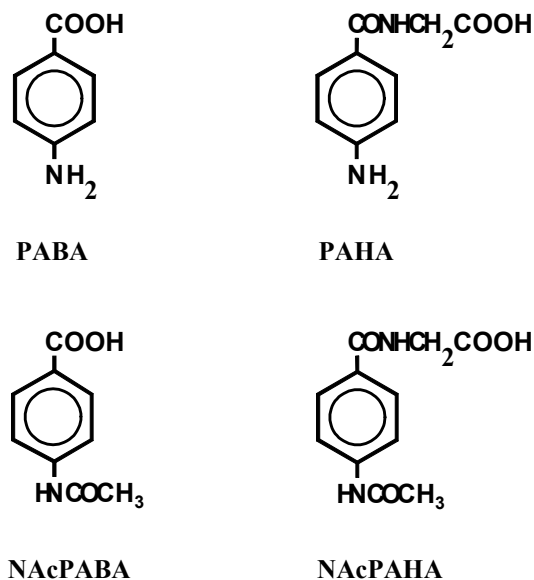
PABA-Derivate als Arzneimittel. Lokalanästhetika vom Estertyp (Benzocain, Procain, Tetracain) enthalten eine PABA-Struktur im Molekül. NAcPABA ist Bestandteil des Immunmodulators Inosin Pranobex[®] (Campoli-Richards *et al.*, 1986).

PABA-Derivate als Diagnostika. Im Bentiromid-Test zur Überprüfung der Pankreas-Funktion wird Patienten das synthetische Peptid *N*-Benzoyl-*L*-Tyrosyl-*p*-Aminobenzoessäure oral verabreicht, wobei PABA durch die Endopeptidase Chymotrypsin abgespalten wird. Störungen der Pankreas-Funktion resultieren im vergleichsweise geringeren Auftreten von PABA und dessen Metaboliten im Urin (Karnes *et al.*, 1985, Yung-Jato *et al.*, 1988).

PABA als Hemmer der Thrombozytenaggregation. Die Ergebnisse der Untersuchungen von Barbieri *et al.* (1997) lassen vermuten, dass PABA und NAcPABA in ähnlicher Weise wie die strukturverwandte Acetylsalicylsäure hemmend auf die Thrombozytenaggregation wirken können. Zunächst war nachgewiesen worden, dass PABA die durch Thrombin induzierte Thromboxan-Produktion hemmen kann, wobei der zugrundeliegende Mechanismus noch ungeklärt ist. Barbieri *et al.* (1999) zeigten, dass sowohl PABA als auch NAcPABA eine signifikante Verringerung der ADP- bzw. Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation sowie eine Verringerung der für die Aggregation bedeutsamen intrazellulären Ca²⁺-Freisetzung bewirkt hatten.

PABA-Stoffwechsel. Orale aufgenommene PABA sowie das Acetylierungsprodukt *p*-Acetamidobenzoessäure (NAcPABA) werden im weiteren Stoffwechsel an Glycin und Glucuronsäure gebunden. Die Metaboliten *p*-Aminohippursäure

(PAHA), *p*-Acetamidohippursäure (NAcPAHA), PABA-Glucuronid (PABA-Glu) und NAcPABA-Glucuronid (NAcPABA-Glu) sind im Urin nachweisbar (Schema 6).



Schema 6: Formeln von PABA, NAcPABA, PAHA und NAcPAHA.

Chen *et al.* (1988) untersuchten das Verhältnis der PABA-Metaboliten im Urin eines Probanden nach einmaliger oraler Applikation von 800 mg der Substanz (siehe Tab. 9). Dabei wurde nur ein sehr geringer Anteil PABA (0,3%) unverändert ausgeschieden. 47,5% der Dosis wurden durch NAT1 acetyliert, 6,6% des Produkts lagen als Glucuronid und 29,1% als *p*-Acetamidohippursäure-Konjugat vor. 50,5% der PABA-Dosis waren mit Glucuronsäure bzw. Glycin konjugiert.

Tab. 9: Verhältnis von PABA, PABA-Glu, NAcPABA, NAcPABA-Glu, PAHA und NAcPAHA im 24-h-Urin nach einmaliger Applikation von 800 mg PABA, Gesamtwiederfindung 98% (nach Chan *et al.*, 1988).

Substanz	PABA	PABA-Glu	NAcPABA	NAcPABA-Glu	PAHA	NAcPAHA	Total
Anteil (%)	0,3	2,4	11,8	6,6	48,1	29,1	98,3

Der genetische Polymorphismus der Arylamin-N-Acetyltransferase 1

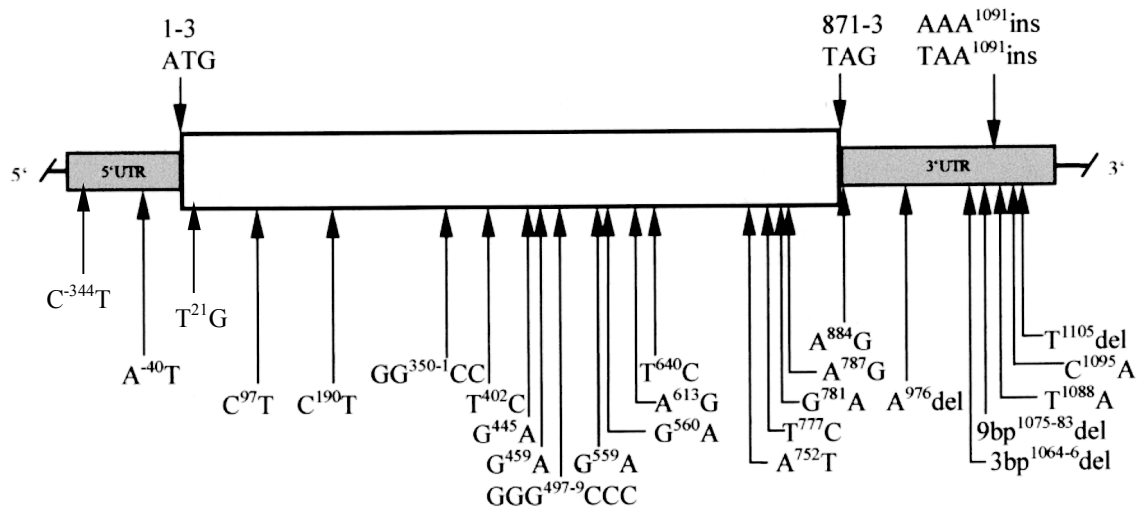
Historisches. Während der genetische Polymorphismus von NAT1 erst zu Beginn der 90er Jahre entdeckt wurde, ist die genetische Variabilität der NAT2 schon seit den fünfziger Jahren bekannt. Die ersten Hinweise darauf gaben in Studien von Hughes (1955) und Biehl *et al.* (1957) interindividuelle Unterschiede im Metabolismus von Isoniazid. Mitchell und Bell teilten 1957 erstmalig Patienten eines Kollektivs in „schnelle Acetylierer“ und „langsame Acetylierer“. Die Vermutung eines genetischen Hintergrundes für diese Unterschiede wurde erstmalig 1958 von Mitchell *et al.* formuliert. Inzwischen sind zahlreiche Mutationen im NAT2-Gen entdeckt sowie deren funktionelle Relevanz aufgeklärt worden (Cascorbi *et al.*, 1999).

Auch bei der Umsetzung spezifischer NAT1-Substrate wurde bereits in den sechziger Jahren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine teilweise beträchtliche Variabilität beobachtet. Beispielsweise fand Jenne (1965) eine zweifache Variabilität der Plasmahalbwertszeiten von PAS und eine vierfache Variation im Verhältnis N-Acetyl-PAS/PAS im Urin (n = 11). Bei der N-Acetylierung von PABA in Hämolysat (n = 200) beobachtete man eine drei- bis sechsfache Variabilität (Weber and Vatsis, 1993). Diese Ergebnisse wurden jedoch zunächst nicht mit einem NAT1-Polymorphismus in Verbindung gebracht, sondern teilweise durch eine Instabilität des Enzyms erklärt (Grant *et al.*, 1991). Mutationen im NAT1-Gen wurde erstmalig 1993 von Vatsis und Weber durch DNA-Sequenzierung entdeckt. Damit war die über viele Jahre für NAT1 verwendete Bezeichnung „monomorphes Enzym“ als überholt zu betrachten und o.g. Ergebnisse durch Genvarianten erklärbar.

NAT1-Allele. Seitdem sind zahlreiche Mutationen nicht nur bei den humanen NATs, sondern auch bei denen von Ratte, Maus, Hamster, Kaninchen, Huhn und einigen Bakterien nachgewiesen geworden. Aktuelle Listen finden sich im Internet unter: <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>. Tab. 10 gibt einen Überblick die bisher entdeckten humanen NAT1-Allele, in Schema 7 sind die Mutationen des Gens dargestellt.

Tab. 10: Humane NAT1-Allele (<http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>).

Allel	Mutation	Aminosäureaustausch	Literatur
NAT1*3	C ¹⁰⁹⁵ A	kein	Blum <i>et al.</i> , 1990
NAT1*4	keine ("Wildtyp")	kein	Vatsis/Weber, 1993
NAT1*5	G ^{350,351} C, G ⁴⁹⁷⁻⁴⁹⁹ C, A ⁸⁸⁴ G, Δ ⁹⁷⁶ , Δ ¹¹⁰⁵	Arg ¹¹⁷ →Thr, Arg ¹⁶⁶ →Thr, Glu ¹⁶⁷ →Gln	Ohsako/Deguchi, 1990
NAT1*10	T ¹⁰⁸⁸ A, C ¹⁰⁹⁵ A	kein	Vatsis/Weber, 1993
NAT1*11A	C ⁻³⁴⁴ T, A ⁻⁴⁰ T, G ⁴⁴⁵ A, G ⁴⁵⁹ A, T ⁶⁴⁰ G, [AAT] ₃ -Deletion zw. 1077-1085, C ¹⁰⁹⁵ A	Val ¹⁴⁹ →Ile, Ser ²¹⁴ →Ala	Doll <i>et al.</i> , 1997
NAT1*11B	C ⁻³⁴⁴ T, A ⁻⁴⁰ T, G ⁴⁴⁵ A, G ⁴⁵⁹ A, T ⁶⁴⁰ G, [AAT] ₃ -Deletion zw. 1077-1085	Val ¹⁴⁹ →Ile, Ser ²¹⁴ →Ala	Johnson/Sim, 2000
NAT1*14A	G ⁵⁶⁰ A, T ¹⁰⁸⁸ A, C ¹⁰⁹⁵ A	Arg ¹⁸⁷ →Gln	Hughes <i>et al.</i> , 1998 Payton/Sim, 1998
NAT1*14B	G ⁵⁶⁰ A	Arg ¹⁸⁷ →Gln	Payton/Sim, 1998 Hubbard <i>et al.</i> , 1998
NAT1*15	C ⁵⁵⁹ T	Arg ¹⁸⁷ →Stop	Hughes <i>et al.</i> , 1998 Hubbard <i>et al.</i> , 1998
NAT1*16	[AAA]-Insertion nach 1091, C ¹⁰⁹⁵ A	kein	de Leon <i>et al.</i> , 1996
NAT1*17	C ¹⁹⁰ T	Arg ⁶⁴ →Trp	Butcher <i>et al.</i> , 1998 Lin <i>et al.</i> , 1998
NAT1*18A	Δ3 zwischen 1064 und 1087, T ¹⁰⁸⁸ A, C ¹⁰⁹⁵ A	kein	Deitz <i>et al.</i> , 1997
NAT1*18B	Δ3 zwischen 1064 und 1091	kein	Deitz <i>et al.</i> , 1997
NAT1*19	C ⁹⁷ T	Arg ³³ →Stop	Lin <i>et al.</i> , 1998
NAT1*20	T ⁴⁰² C	kein	Lin <i>et al.</i> , 1998
NAT1*21	A ⁶¹³ G	Met ²⁰⁵ →Val	Lin <i>et al.</i> , 1998
NAT1*22	A ⁷⁵² T	Asp ²⁵¹ →Val	Lin <i>et al.</i> , 1998
NAT1*23	T ⁷⁷⁷ C	kein	Lin <i>et al.</i> , 1998
NAT1*24	G ⁷⁸¹ A	Glu ²⁶¹ →Lys	Lin <i>et al.</i> , 1998
NAT1*25	A ⁷⁸⁷ G	Ile ²⁶³ →Val	Lin <i>et al.</i> , 1998
NAT1*26A	[TAA]-Insertion zwischen 1066 und 1091, C ¹⁰⁹⁵ A	kein	Deitz <i>et al.</i> , 1998
NAT1*26B	[TAA]-Insertion zwischen 1066 und 1091	kein	Deitz <i>et al.</i> , 1998
NAT1*27	T ²¹ G, T ⁷⁷⁷ G	kein	Smelt <i>et al.</i> , 2000
NAT1*28	[TAATAA]-Deletion zwischen 1085 und 1090	kein	Lo-Guidice <i>et al.</i> , 1999
NAT1*29	T ¹⁰⁸⁸ A, C ¹⁰⁹⁵ A, Δ ¹⁰²⁵	kein	Lo-Guidice <i>et al.</i> , 1999



Schema 7: Mutationen im *NAT1*-Gen (nach Lo-Guidice *et al.*, 2000). 5', 3'UTR: *untranslated region*, Bereiche außerhalb der proteinkodierenden Region des Gens.

Ethnische Unterschiede. Das Ziel bisheriger Studien bestand vor allem im Auffinden bisher unbekannter Mutationen des *NAT1*-Gens und der Untersuchung der funktionellen Relevanz dieser Allele. Es existieren nur wenige Befunde über die Verbreitung der *NAT1*-Mutationen in verschiedenen ethnischen Gruppen. Tab. 11 zeigt, dass das *NAT1*4*-Allel außer bei Chinesen und Malaysiern in den Populationen am stärksten verbreitet ist, unter Europäern und Nordamerikanern zu ca. 75%. In der japanischen Studie betrug die Häufigkeit des Wildtyp-Allels nur 55,7%, das *NAT1*10* Allel trat fast ebenso häufig auf (41,8%). Eine stärkere Verbreitung dieses Allels unter Japanern im Vergleich zu anderen Bevölkerungsgruppen kann vermutet werden. Auffällig ist der hohe Anteil des *NAT1*3*-Allels in der Studie von Zhao *et al.* (1998). Weitere Untersuchungen, vor allem auch zur Verbreitung der selteneren Allele in verschiedenen Populationen, sind notwendig.

Tab. 11: Erkenntnisstand zur interethnischen Verbreitung der *NAT1*-Allele.

Population (Zahl der Individuen)	Allelhäufigkeit in der Population (%)										Literatur
	*3	*4	*10	*11	*14A	*14B	*15	*17	*22	*24	
Dänen (471)	n.b.	73,9	24,7	1,4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	Okkels <i>et al.</i> , 1997
Engländer (32)	1,6	75,0	18,8	1,6	1,6	1,6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	Payton/ Sim, 1998
Engländer (112)	2,7	77,7	16,1	4,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	Bell <i>et al.</i> , 1995a
Franzosen (322)	2,0	74,4	20,5	1,4	1,7	0	0	n.b.	n.b.	n.b.	Bouchardy <i>et al.</i> , 1998
Nordamerikaner (□) (328)	3,0	74,2	17,4	1,2	2,0	0	0,3	1,1	0,8	n.b.	Zheng <i>et al.</i> , 1999 ^a
Japaner (122)	2,5	55,7	41,8	0	0	0	0	0	n.b.	n.b.	Katoh <i>et al.</i> , 1998
Inder (140)	30,0	51,0	17,0	2,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	Zhao <i>et al.</i> , 1998 ^b
Chinesen (181)	33,0	30,0	39,0	2,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
Malaysier (122)	29,0	30,0	39,0	2,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	

^a Tests auf das Vorhandensein der Allele *NAT1*5*, *NAT1*16* und *NAT1*19* waren negativ. ^b Tests auf das Vorhandensein des Allels *NAT1*5* waren negativ.

Funktionelle Relevanz der *NAT1*-Mutationen. Zur funktionellen Relevanz der *NAT1*-Mutationen, insbesondere der selten auftretenden Allele, liegen bisher nur wenige, teilweise uneinheitliche Daten vor. Tab. 12 stellt die Ergebnisse der bisherigen Studien im Überblick dar. Ob das Genprodukt des *NAT1*10*-Allels eine höhere Aktivität im Vergleich zum Genprodukt des Wildtyp-Allels besitzt, wird derzeit kontrovers diskutiert. Auch bezüglich des Genprodukts des *NAT1*11*-Allels kann in dieser Hinsicht keine eindeutige Aussage getroffen werden. *NAT1*14A*, *NAT1*14B* und *NAT1*16* kodieren nach bisherigen Erkenntnissen Enzyme mit verminderter Aktivität, während die Produkte von *NAT1*15* und *NAT1*22* funktionslos sind. Bezüglich der relativ selten auftretenden Allele *NAT1*16*, *NAT1*17*, *NAT1*21*, *NAT1*22*, *NAT1*24* und *NAT1*25* ist der Datenumfang gering.

Tab. 12: Erkenntnisstand zur funktionellen Relevanz von *NAT1*-Allelen.

Allel	Untersuchungsobjekt	Vergleich der <i>in vitro</i> -Acetylierung von Standard- substraten ^a	Literatur
<i>NAT1*10</i>	Blasen- und Dickdarmschleimhaut	$NAT1\ 4 < NAT1\ 10$	Bell <i>et al.</i> , 1995a, b
	rekombinantes Humanenzym (<i>E. coli</i>)	$NAT1\ 4 \square NAT1\ 10$	Badawi <i>et al.</i> , 1995
	Erythrozyten	$NAT1\ 4 \square NAT1\ 10$	Hughes <i>et al.</i> , 1998 Payton/Sim, 1998
<i>NAT1*11</i>	rekomb. Humanenzym (<i>E. coli</i>)	$NAT1\ 4 > NAT1\ 11$	Hughes <i>et al.</i> , 1998
	Erythrozyten	$NAT1\ 4 > NAT1\ 11$	Risch <i>et al.</i> , 1996 Payton/Sim, 1998
	rekomb. Humanenzym (<i>E. coli</i>)	$NAT1\ 4 \square NAT1\ 11$	de Leon <i>et al.</i> , 2000
		$NAT1\ 4 < NAT1\ 11$	Doll <i>et al.</i> , 1997
<i>NAT1*14</i>	rekomb. Humanenzym (<i>E. coli</i>)	$NAT1\ 4 > NAT1\ 14$	Hughes <i>et al.</i> , 1998
	Blutzell-Lysat	$NAT1\ 4 > NAT1\ 14$	Butcher <i>et al.</i> , 1998
<i>NAT1*15</i>	rekomb. Humanenzym (<i>E. coli</i>)	keine Aktivität	Hughes <i>et al.</i> , 1998 Lin <i>et al.</i> , 1998
<i>NAT1*16</i>	Leukozyten-Zytosol, rekomb. Humanenzym (COS-1-Zellen)	$NAT1\ 4 > NAT1\ 16$	de Leon <i>et al.</i> , 2000
<i>NAT1*17</i>	rekomb. Humanenzym (<i>E. coli</i>)	keine Aktivität	Lin <i>et al.</i> , 1998
	Blutzell-Lysat	$NAT1\ 4 > NAT1\ 17$	Butcher <i>et al.</i> , 1998
<i>NAT1*21</i>	rekomb. Humanenzym (<i>E. coli</i>)	$NAT1\ 4 < NAT1\ 21$	Lin <i>et al.</i> , 1998
<i>NAT1*22</i>	rekomb. Humanenzym (<i>E. coli</i>)	Keine Aktivität	Lin <i>et al.</i> , 1998
<i>NAT1*24</i>	rekomb. Humanenzym (<i>E. coli</i>)	$NAT1\ 4 < NAT1\ 24$	Lin <i>et al.</i> , 1998
<i>NAT1*25</i>	rekomb. Humanenzym (<i>E. coli</i>)	$NAT1\ 4 < NAT1\ 25$	Lin <i>et al.</i> , 1998

^a Standardsubstrate: PABA, PAS, SMZ

NAT1-NAT2-linkage. Wegen des geringen chromosomalen Abstandes von *NAT1* und *NAT2* wird zur Zeit die Frage der Kopplung der beiden Gene (*genetic linkage*) und die daraus folgende gekoppelte Vererbung der Merkmale intensiv diskutiert. In einer Gruppe von 709 gesunden Probanden trat das *NAT1*10*-Allel signifikant häufiger bei homozygoten Trägern des *NAT2*-Wildtyp-Allels (*NAT2*4/*4*) auf (Cascorbi *et al.*, 1999). In einer Studie von Smelt *et al.* (1998) war die Kombination *NAT1*10/NAT2*4* 3,5mal häufiger vertreten als erwartet. In anderen Studien deuteten die Ergebnisse nicht auf das Vorhandensein eines *genetic linkage* zwischen *NAT1* und *NAT2* hin (Hubbard *et al.*, 1998, Bruhn *et al.*, 1999).

Pathophysiologische und toxikologische Bedeutung des genetischen Polymorphismus der Arylamin-N-Acetyltransferase 1

Epidemiologische Studien zur Klärung eines Zusammenhangs zwischen dem NAT2-Polymorphismus und dem Risiko von Tumorerkrankungen ergaben, dass Individuen mit hoher NAT2-Aktivität ein höheres Risiko der Erkrankung an Lungen- Kehlkopf- und Dickdarmkrebs besitzen; bei Blasenkrebs führt eine niedrige NAT2-Aktivität zu einem höheren Risiko (Cascorbi *et al.*, 1996, Henning *et al.*, 1998, Roberts-Thomson *et al.*, 1999, Brockmöller *et al.*, 1996). Auch für NAT1 wird nach Zusammenhängen zwischen der genetischen Disposition und dem individuellen Risiko einer malignen Erkrankung, der individuellen Reaktion auf chemische Mutagene oder dem Auftreten einer Arzneimittel-Nebenwirkung gesucht. Im folgenden soll ein umfassender Überblick über die Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien zu dieser Thematik gegeben werden.

Bauchspeicheldrüsenkrebs. In einer Studie von Bartsch *et al.* (1998) waren Träger eines *NAT1*3*-, *NAT1*4*- oder *NAT1*11*-Allels im Vergleich zu den homozygoten oder heterozygoten Trägern eines *NAT1*10*-Allels tendenziell, aber nicht signifikant häufiger unter den Erkrankten vertreten ($n = 81/78$, $p = 0,18$). Ausgehend von der Hypothese, dass *NAT1*10* ein Enzym mit erhöhter Aktivität kodiert, erklären die Autoren diesen Befund mit der verstärkten Entgiftung von karzinogenen Aminen wie beispielsweise PhIP bei Trägern dieses Allels.

Blasenkrebs. Von CYP1A2 aus aromatischen Aminen gebildeten *N*-Hydroxy-Arylamine (siehe Schema 5) können von der NAT1 der Blasenschleimhaut zu instabilen *N*-Acetoxy-Estern aktiviert werden, die zu Nitrenium-Ionen mit der Fähigkeit zur Bildung kovalenter DNA-Addukte zerfallen; ein C-8-substituiertes Deoxyguanosin-Derivat gilt als das am häufigsten vorkommende Addukt. In einer Studie von Badawi *et al.* (1995) war die nachweisbare Zahl dieser DNA-Addukte bei Individuen mit dem Genotyp *NAT1*4/*10* ($n = 8$) doppelt so hoch wie bei homozygoten Trägern des Wildtyp-Allels ($n = 17$). Die Autoren postulierten daher, dass Träger des *NAT1*10*-Allels einem erhöhten Blasenkrebsrisiko ausgesetzt sind. Diese Hypothese konnte in einer Fall/Kontroll-Studie ($n = 254/242$) von Okkels *et al.* (1997) nicht bestätigt werden. Es wurde kein Zusammenhang

zwischen *NAT1*-Mutationen und dem Auftreten von Blasenkrebs festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde in einer Blasenkrebs-Studie in der Berliner Bevölkerung eine signifikante Überrepräsentation der Allele *NAT1*11*, *NAT1*14* und *NAT1*15* unter den Erkrankten gefunden ($n = 424/341$, Brockmöller *et al.*, 1998).

Brustkrebs. Als eine mögliche Ursache für die Entstehung von Brustkrebs wird die Bildung von DNA-Addukten infolge der Einwirkung genotoxischer Substanzen betrachtet. In einer Studie von Pfau *et al.* (1998) wurde das Gewebe von Brustkrebs-Patientinnen auf das Vorhandensein dieser Addukte untersucht. Die die DNA-Modifikationen auslösenden Chemikalien konnten nicht identifiziert werden. Es wurde kein Zusammenhang zwischen der Zahl der DNA-Addukte und dem *NAT1*-Genotyp der Patientinnen gefunden. In einer Fall/Kontroll-Studie ($n = 53/101$) von Zheng *et al.* (1999) war das Brustkrebs-Risiko bei Patientinnen mit mindestens einem *NAT1*10*-Allel leicht, aber nicht signifikant erhöht. Trägerinnen eines *NAT1*11*-Allels besaßen dagegen ein um nahezu das Vierfache erhöhtes Risiko ($n = 11/7$, OR = 3,8; 95% VB 1,4 – 10,2). Als begünstigende Faktoren für die Entstehung von Brustkrebs wurden das Rauchen und bestimmte Ernährungsgewohnheiten (häufiger Verzehr von *well done* zubereitetem Fleisch) erkannt. In einer Fall/Kontroll-Studie mit 498/473 Individuen gab es keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem *NAT1*-Genotyp allein und dem Risiko, an Brustkrebs zu erkranken (Millikan *et al.*, 1998). Das Risiko für Raucherinnen mit mindestens einem *NAT1*10*-Allel (OR = 9,0; 95% VB 1,9 – 41,8) lag jedoch höher als das für Raucherinnen ohne dieses Allel (OR = 2,5; 95% VB 0,9 – 7,2).

Dickdarmkrebs. Das Risiko einer Erkrankung an dieser Krebsart scheint in hohem Maße mit dem Umfang der Exposition mit Karzinogenen wie PhIP, MeIQ, MeIQx, Glu-P2 und IQ (vgl. Tab. 7) verbunden zu sein. Diese Karzinogene sind vor allem in gekochtem und gegrilltem Fleisch und Fisch und Zigarettenrauch vorhanden, so dass bestimmte Lebens- und Ernährungsgewohnheiten das Risiko einer Dickdarmkrebserkrankung erhöhen könnte. Die durch *NAT1* oder *NAT2* katalysierte Bioaktivierung dieser Substrate führt über verschiedene Zwischenprodukte (vgl. Schema 5) zu DNA- und protein-reaktiven Nitrenium-Ionen. Es konnte gezeigt werden, dass ein häufiger Verzehr von gekochtem

Fleisch bei Individuen mit hoher NAT1- und/oder NAT2-Aktivität ein höheres Risiko für Dickdarmkrebs in sich birgt (Roberts-Thomson *et al.*, 1999). Moisio *et al.* (1998) suchten bei 341 an Dickdarmkrebs erkrankten finnischen Individuen nach Zusammenhängen zwischen dem NAT1-Polymorphismus und der Lokalisation der Tumoren (proximal, distal) sowie dem Zeitpunkt des Auftretens der Erkrankung. Das erstmalige Auftreten der Erkrankung war in dieser Studie bei Trägern eines *NAT1*10*-Allels zu jüngerem Lebensalter hin verschoben. Außerdem waren bei diesen Individuen distale Tumoren signifikant häufiger vertreten. In Untersuchungen von Bell *et al.* (1995a) war das *NAT1*10*-Allel bei Patienten mit Dickdarmkrebs überrepräsentiert. Diese Befunde konnten in Studien von Probst-Hensch *et al.* (1996), Hubbard *et al.* (1998) und Katoh *et al.* (2000) nicht bestätigt werden. Auch in einer umfangreichen Studie von Lin *et al.* (1998) mit 932 Probanden konnte kein Zusammenhang zwischen verschiedenen *NAT1*-Mutationen und dem Auftreten von Dickdarmkrebs gefunden werden.

Lungenkrebs. Abdel-Rahman *et al.* (1998) fanden bei *NAT1*10*-Individuen ein 3,7fach erhöhtes Lungenkrebs-Risiko im Vergleich zur Kontrollgruppe (95% VB 1,2 – 16,0). Im Vergleich zu Individuen mit dem *NAT1*3/*4*- bzw. *NAT1*4/*4*-Genotyp besaßen in einer Fall/Kontroll-Studie (n = 91/95) von Bouchardy *et al.* (1998) Träger von mindestens einem *NAT1*10*- oder *NAT1*11*-Allel ein geringeres Lungenkrebs-Risiko (OR = 0,2; 95% VB 0,03 – 0,7 für *NAT1*10/*10* bzw. *NAT1*10/*11*, n = 2/14; OR = 0,6; 95% VB 0,4 – 1,1 für *NAT1*4/*10* *NAT1*4/*11* und *NAT1*3/*10*, n = 50/60). Für Träger eines *NAT1*14*-Allels, d.h. die Genotypen *NAT1*4/*14* und *NAT1*3/*14*, war das Risiko erhöht (n = 7/3, OR = 1,8; 95% VB 0,4 – 9,4).

Magenkrebs. In einer Fall/Kontroll-Studie (Katoh *et al.*, 2000) mit 140 Magenkrebs-Patienten und 122 gesunden Kontrollindividuen war das Risiko, an dieser Krebsart zu erkranken, bei Trägern des *NAT1*10*-Allels, die außerdem starke Raucher waren, signifikant erhöht (OR = 3,0; 95% VB 1,2 – 7,1).

Mundhöhlen-, Rachen- und Kehlkopfkrebs. In einer fallkontrollierten Studie mit an Mundhöhlenkrebs erkrankten Japanern (n = 62/122, Katoh *et al.*, 1998) wurde ein höheres Risiko bei Individuen mit dem *NAT1*10*-Allel im Vergleich zu

homozygoten Trägern des *NAT1**3 bzw. *NAT1**4-Allels festgestellt (OR = 3,7; 95% VB 1,6 – 8,5 für *NAT1**4/*10 und OR = 3,3; 95% VB 1,3 – 8,6 für *NAT1**10/*10). Kein Zusammenhang zwischen dem NAT1-Polymorphismus und dem Auftreten von Mundhöhlen-, Rachen- oder Kehlkopfkrebs wurde dagegen in einer Studie von Jourenkova-Mironova *et al.* (1999) mit 250 Patienten und 172 Kontroll-Individuen gefunden. Auch Henning *et al.* (1999) konnten in einer Fall/Kontroll-Studie (n = 255/510) keine Überrepräsentation eines mutierten *NAT1*-Allels bei Kehlkopfkrebs-Patienten feststellen.

Prostatakrebs. Obwohl die Ursachen für die Entstehung von Prostatakrebs noch nicht vollständig geklärt sind, spielen offensichtlich bestimmte Ernährungsgewohnheiten dabei eine Rolle. Es konnte nachgewiesen werden, dass der häufige Verzehr von gekochtem Fleisch oder Fisch die Entstehung dieser Krebsart fördert. Ursache dafür sind wahrscheinlich darin enthaltene heterozyklische Amine wie PhIP und MeIQx (siehe Tab. 7), die nach *N*-Oxidation durch CYP1A2 und Bioaktivierung durch Arylamin-*N*-Acetyltransferasen zu *N*-Acetoxy-Aminen und schließlich Nitrenium-Ionen (siehe Schema 5) nachweislich DNA-Addukte in Prostatageweben bilden können. Die am häufigsten vorkommenden Addukte sind dabei Desoxyguanosyl-8-Cytosinoyl-MeIQx bzw. Desoxyguanosyl-8-Cytosinoyl-PhIP (Wang *et al.*, 1999). Fukutome *et al.* (1999) fanden bei Individuen mit dem *NAT1**10/*10-Genotyp ein signifikant erhöhtes Risiko im Auftreten von Prostatakrebs im Vergleich zu heterozygoten Trägern von *NAT1**10 bzw. Individuen ohne dieses Allel (OR = 2,4; 95% VB 1,0 – 5,6). Die Autoren postulierten ein verstärktes Auftreten o.g. DNA-Addukte von heterozyklischen Aminen bei homozygoten *NAT1**10-Trägern infolge der vermuteten höheren Enzymaktivität von NAT1 10.

Bioaktivierung von Fremdstoffen. An der Entgiftung und metabolischen Aktivierung von aromatischen und heterozyklischen Aminen sind nach bisherigen Erkenntnissen neben NAT1 und NAT2 auch Cytochrom P450-Isoenzyme und Prostaglandin-H-Synthasen direkt beteiligt (siehe Schema 5). Obwohl ein Beweis für die Entstehung von Tumoren bedingt durch diese Substanzen bisher nur bei Nagern und Affen erbracht werden konnte, stellen sie potentielle Karzinogene auch für den Menschen dar (Liu and Levy, 1998). Von besonderem Interesse sind

die Substanzen 4-Aminobiphenyl, β -Naphthylamin, IQ, PhIP, MeIQ, MeIQx und Glu-P2 (siehe Tab. 7), da sie im Zigarettenrauch enthalten sind bzw. beim Kochen und Grillen von Fleisch infolge der Pyrolyse von Aminosäuren in Gegenwart von Kreatin entstehen. Die Biotransformation dieser Substanzen führt zu Arylnitrenium-Ionen, die DNA-Addukte bilden können. Für MeIQx und PhIP konnte eine Bildung derartiger Addukte in humanen Geweben (Totsuka *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1999) und für IQ unter Vermittlung von rekombinanten humanen Enzymen (PHS-1, PHS-2, NAT1, NAT2) bereits nachgewiesen werden (Liu and Levy, 1998).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass trotz teilweise umfangreicher Studien keine eindeutige Beziehung zwischen dem *NAT1*-Genotyp und dem Risiko einer Erkrankung an Blasen-, Brust-, Dickdarm-, Lungen-, Mundhöhlen-, Rachen- oder Kehlkopfkrebs gefunden werden konnte. Für Magen- und Prostatakrebs gibt es Hinweise darauf, dass Träger mindestens eines *NAT1*10*-Allels ein größeres Risiko besitzen, für die Erkrankung an Bauchspeicheldrüsenkrebs stellt die Anwesenheit von *NAT1*10* im Genotyp möglicherweise einen Schutzfaktor dar. Diese Aussagen sind jedoch jeweils erst durch eine Studie belegt.

Bei der Metabolisierung von Fremdstoffen stellt nach bisherigen Erkenntnissen eine hohe NAT1-Aktivität in Verbindung mit bestimmten Lebens- und Ernährungsgewohnheiten einen Risikofaktor für genetische Schäden dar. Allerdings muss die NAT1-Aktivität im Zusammenspiel mit anderen, an der Entgiftung bzw. metabolischen Aktivierung beteiligten Biotransformationsenzymen wie NAT2, CYP1A2 und PHS betrachtet werden.

3 Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

3.1 Glutathion-S-Transferase Theta 1-1

3.1.1 Genotypisierung der Probanden

Allgemeines

Die Genotypisierung der Probanden erfolgte in Anlehnung an eine von Pemble *et. al.* (1992) entwickelte Methode. Im folgenden soll ein Überblick über die Prinzipien der durchgeführten Arbeitsschritte zur DNA-Extraktion, zur Amplifizierung des DNA-Abschnittes mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und zu dessen Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese gegeben werden. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Reaktionsansätze ist in Kapitel 4.4.1 beschrieben.

DNA-Extraktion

Zunächst erfolgte eine Isolierung der Leukozyten aus den Blutproben der Probanden. Das Blut wurde dazu mit Erythrozyten-Lysis-Puffer versetzt, nach einer 30minütigen Inkubationszeit (auf Eis) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Sediment erneut in Erythrozyten-Lysis-Puffer aufgenommen. Nach Wiederholung der Prozedur wurde das resuspendierte Sediment bis zur DNA-Extraktion bei -20°C eingefroren. Zur DNA-Extraktion wurde die aufgetaute Zellsuspension zunächst mit Proteinase K über Nacht verdaut. Dann folgten ein Extraktionsschritt mit Phenol zur Entfernung der Proteine sowie ein Extraktionsschritt mit Chloroform-Isoamylalkohol zur Entfernung von Lipiden und Phenolresten. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase mit Natriumacetat und dem dreifachen Volumen 96%igen Alkohols versetzt. Die DNA wurde durch Zentrifugation sedimentiert, gewaschen und in Puffer aufbewahrt. Die auf diese Weise gewonnene DNA der Probanden wurde für deren Genotypisierung hinsichtlich *GSTT1* und/oder *NAT1* verwendet.

Polymerase-Kettenreaktion

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion beruht auf der Synthese von DNA-Amplifikaten durch thermostabile DNA-Polymerasen an einer einsträngigen DNA-Matrize unter Verwendung von speziellen Oligonukleotid-Startmolekülen (Primern). Die Primer werden so ausgewählt, dass sie dem 5'- bzw. dem 3'-terminalen Ende des zu vermehrenden DNA-Abschnittes entsprechen. In einem geeigneten Reaktionspuffer wurde eine kleine Menge DNA-Matrize (10 - 1000 ng) mit DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotid-5'-triphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) sowie den Primern GT1 und GT2 (siehe 4.4.1) inkubiert. Es wurde ein spezifischer 459 bp-DNA-Abschnitt des Gens amplifiziert. Ein mit Hilfe der Primer BNF3 und BNF5 coamplifizierter Abschnitt des β -Interferon-Gens diente als interner Standard zur Detektion falsch negativer Ergebnisse.

Die Reaktionszyklen der Polymerase-Kettenreaktion bestehen aus drei Teilschritten. Im Teilschritt *Denaturierung* werden die beiden Stränge der DNA-Doppelhelix bei 92 - 95°C getrennt. Im Teilschritt *Primeranlagerung (Annealing)* lagern sich die Primer nach Abkühlung auf die Anlagerungstemperatur (40 - 72°C) komplementär an die jeweiligen Zielsequenzen der Matrizen-DNA an. Im Teilschritt *Kettenverlängerung (Elongation)* wird mit Hilfe der Taq™-Polymerase, einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, bei der optimalen Reaktionstemperatur von 72°C ein neuer DNA-Doppelstrang synthetisiert. Wegen der Hitzestabilität der DNA-Polymerase kann sich der nächste Reaktionszyklus ohne Zugabe von frischer DNA-Polymerase oder Zwischenreinigungsschritte anschließen. Dies ermöglicht die Automatisierung der PCR unter Verwendung eines programmierbaren Thermostaten (Thermocycler), so dass mehrere PCR-Zyklen (20 - 35) in ca. zwei bis vier Stunden durchgeführt werden können.

Bei der PCR mit den Primern GT1 und GT2 entstand ein Amplifikat mit einer Länge von 459 bp, wenn mindestens ein *GSTT1**A-Allel vorlag. Demnach konnten der homozygote *GSTT1**A/A-Genotyp sowie der heterozygote *GSTT1**A/0-Genotyp durch den Nachweis des 459 bp-Amplifikats von dem homozygoten *GSTT1**0/0-Genotyp durch dessen Fehlen differenziert werden.

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von PCR-Produkten werden häufig Agarosegele verwendet. Die Wanderung der DNA-Abschnitte im elektrischen Feld beruht auf den negativen Ladungen ihrer Phosphatgruppen im verwendeten Puffer (pH = 8). Agarose ist ein lineares Polymer aus alternierenden D-Galactose- und 3,6-Anhydro-L-galactoseresten. Durch Ausbildung einer Netzstruktur entsteht ein Molekularsieb, welches die Wanderung größerer DNA-Abschnitte stärker behindert als die kleineren. Die zu verwendende Agarosekonzentration (1,5 - 4%) richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Amplifikate.

Das 459 bp- und das 170 bp-Amplifikat der *GSTT1*-PCR wurden in einem 3%igem NuSieve® 3:1-Gel 90 min bei 120 V aufgetrennt. Zur Längenbestimmung wurde eine kommerziell erhältliche 100 bp-DNA-Standard-Leiter mitgeführt. Der im Elektrophoresegel enthaltene Farbstoff Ethidiumbromid bindet an die doppelsträngige DNA durch Interkalation. Unter UV-Licht (310 nm) sind die Amplifikate als fluoreszierende Banden sichtbar. Die Ergebnisse der *GSTT1*-Gelelektrophorese wurden mit einer Polaroidkamera dokumentiert. Abb. 1 zeigt ein Elektrophoresegel, das nach Analyse der Blutproben von vier Probanden erhalten wurde.

Genotypisierung der Probanden: Ergebnisse und Diskussion

Wie in Tab. 13 dargestellt, konnten bei 243 der 300 genotypisierten Probanden nach PCR und Agarose-Gelelektrophorese sowohl ein 459 bp- als auch ein 170 bp-Amplifikat nachgewiesen werden. Diese Probanden sind Träger des homozygoten *GSTT1**A/A- bzw. des heterozygoten *GSTT1**A/O-Genotyps. Bei 57 Probanden war kein 459 bp-DNA-Abschnitt detektierbar, wobei der Nachweis des 170 bp-DNA-Abschnitts den fehlerfreien Verlauf der PCR und der Gelelektrophorese bestätigte. Diesen Probanden konnte somit der *GSTT1**O/O-Genotyp zugeordnet werden. Die Häufigkeit dieses Genotyps lag in der untersuchten Population bei 19%.

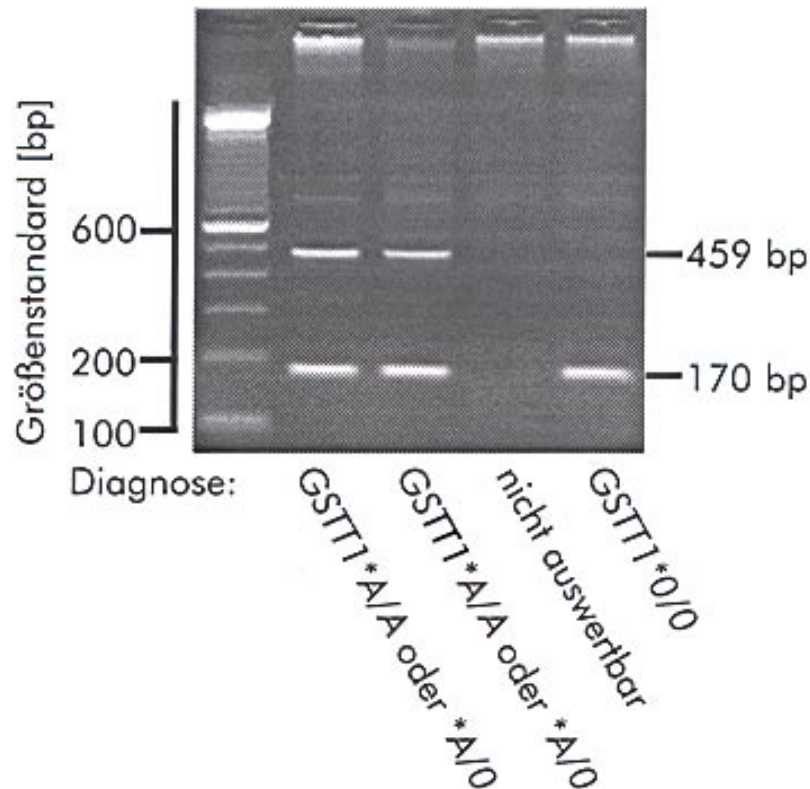


Abb. 1: Elektrophoresemuster nach Analyse der Amplifikate der *GSTT1*-PCR (von links nach rechts). Spur 1: DNA-Größenstandard. Spuren 2 und 3: Amplifikate von zwei Trägern des *GSTT1*A*-Allels. Spur 4: keine Auswertung, da das Amplifikat des internen Standards nicht detektiert werden konnte. Spur 5: Amplifikat eines Probanden mit *GSTT1*-Gendeletion.

Tab. 13: Ergebnisse der *GSTT1*-Genotypisierung von 300 Probanden.

Zahl der Probanden	Amplifikate	Genotyp
243 (81%)	170 bp, 459 bp	<i>GSTT1*A/O</i> - bzw. <i>GSTT1*A/A</i>
57 (19%)	170 bp	<i>GSTT1*0/0</i>

Das Probandenkollektiv setzte sich aus 270 männlichen und nur 30 weiblichen Individuen zusammen und spiegelt damit hinsichtlich des zahlenmäßigen Verhältnisses der Geschlechter nicht die Zusammensetzung der Bevölkerung wider. Dies ist durch die Tatsache begründet, dass sich als Spender der Blutproben vorwiegend männliche Studenten zur Verfügung gestellt hatten. Bei

den bisher vorliegenden epidemiologischen Studien zu GSTT1-1 waren die Geschlechter der Probanden häufig nicht dokumentiert bzw. es überwog wie in vorliegenden Untersuchungen ebenfalls der Anteil der männlichen Personen (Warholm *et al.*, 1994, Lee *et al.*, 1995). Es stellt sich die Frage, ob der GSTT1*0/0-Genotyp bei männlichen und weiblichen Individuen unterschiedlich häufig auftritt. Unter Verwendung von zwei Testverfahren (χ^2 -Test und zweiseitiger exakter Fisher-Test) wurden bei der in dieser Arbeit untersuchten sowie vier weiteren aus der Literatur entnommenen Populationen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit des GSTT1*0/0-Genotyps bei männlichen und weiblichen Probanden festgestellt (siehe Tab. 14). Daher kann die Tatsache, dass das Probandenkollektiv hinsichtlich des zahlenmäßigen Verhältnisses der Geschlechter nicht die Bevölkerung repräsentiert, unberücksichtigt bleiben.

Tab. 14: Häufigkeit des GSTT1*0/0-Genotyps bei männlichen (*m*) und weiblichen (*f*) Probanden in vier ethnischen Gruppen (Deutsche: eigene Daten; Schweden: Warholm *et al.*, 1995; Chinesen, Malaysier und Inder: Lee *et al.*, 1995).

	Deutsche	Schweden	Malaysier	Chinesen	Inder
Gesamtpopulation (n)	300	270	167	187	152
Zusammensetzung der Population <i>m</i> ; <i>f</i> (n)	270;30	181;89	93;74	136;51	97;55
Zahl der GSTT1*0/0-Individuen <i>m</i> ; <i>f</i> (n)	53;4	19;7	36;28	82;27	17;8
Häufigkeit des GSTT1*0/0-Genotyps - insgesamt (%):	19	10	38	58	16
- geschlechtsbezogen (%): <i>m</i> ; <i>f</i>	20;13	10;8	39;38	60;53	14;16

3.1.2 Phänotypisierung der Probanden

Allgemeines

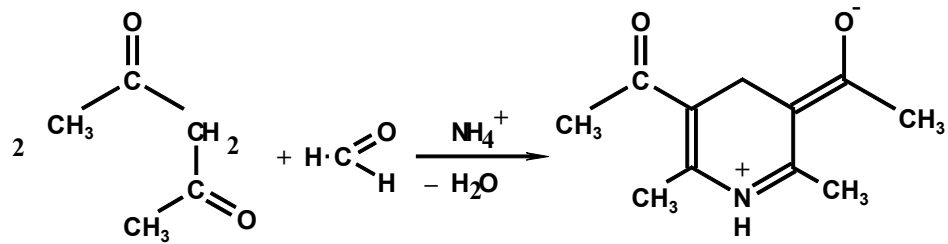
Von den 300 genotypisierten Probanden waren nach dem Zufallsprinzip 140 für die Phänotypisierungs-Studie ausgewählt worden. Der Genotyp dieser Individuen wurde erst nach Abschluss der Untersuchungen bekanntgegeben. Das Ziel bestand darin, mit Hilfe einer rationellen, zuverlässigen Methode im Hämolyolat der Probanden die Geschwindigkeiten des Substratumsatzes bei verschiedenen Konzentrationen zu bestimmen und miteinander zu vergleichen und aus den

Daten der GSTT1-1-aktiven Individuen die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} näherungsweise zu berechnen. Vor den eigentlichen Probenmessungen wurden mit dem Hämolysat einiger Probanden das von Hallier *et al.* (1994) beschriebene Verfahren zur Bestimmung der GSTT1-1-Aktivität auf die konkreten Bedingungen der vorliegenden Studie angepasst. Diese Anpassung umfasste im Rahmen der Methodenetablierung und Validierung die Optimierung der Probenvorbereitung, der Enzymmenge, der Inkubationszeit und der Substrat- und Cosubstratkonzentration, sowie die Prüfungen auf Stabilität und Wiederfindungsrate des Analyten, Präzision, Richtigkeit und Spezifität der verwendeten Methode und verschiedene Untersuchungen zur Kalibrierfunktion. Darüber hinaus erfolgte während der Phänotypisierungs-Studie eine Qualitätssicherung durch Kontrolle der zeitabhängigen Präzision und Richtigkeit der Formaldehydbestimmung sowie der Stabilität des Enzyms unter Lagerungsbedingungen mit Hilfe eines selbst gewonnen Kontrollmaterials. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im folgenden dargestellt. Die genaue Zusammensetzung der Reaktionsansätze und verwendeten Lösungen ist in Kapitel 4.4.3 beschrieben.

Bestimmung von Formaldehyd

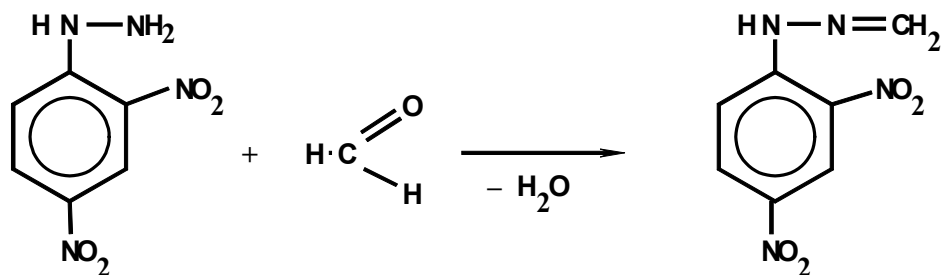
Für die Phänotypisierung wurde Dichlormethan als spezifisches Substrat der GSTT1-1 verwendet. Es zeichnet sich durch seine im Vergleich zu gasförmigen Haloalkanen gute Handhabbarkeit aus und wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen (Hallier *et al.*, 1994) erfolgreich angewendet. Das über den GSTT1-1-abhängigen Stoffwechselweg gebildete Reaktionsprodukt Formaldehyd lässt sich durch die kolorimetrische Methode nach Nash (1953) oder mit einem HPLC-Verfahren in Anlehnung an Grömping und Camman (1989) bestimmen.

Methode nach Nash. Bei der kolorimetrischen Bestimmung nach Nash (1953). reagiert Formaldehyd in Gegenwart überschüssigen Ammoniumsalzes zum Kondensationsprodukt 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrotoluidin (Schema 8), das bei 415 nm fotometrisch vermessen werden kann.



Schema 8: Prinzip der Formaldehydbestimmung nach Nash (Hantzsch-Reaktion).

HPLC-Methode. Die Bestimmung des Formaldehyds mit Hilfe der HPLC-Methode nach Grömping und Camman (1989) erfolgte nach dessen Umsetzung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zum 2,4-Dinitrophenylhydrazon (Schema 9).



Schema 9: Umsetzung von Formaldehyd mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin bei Anwendung der HPLC-Methode.

Die Bildung des Produkts kann erwartungsgemäß durch Temperaturerhöhung beschleunigt werden. Ein Vergleich der Reaktionsabläufe bei 25°C und 37°C ergab, dass bei einer Temperatur von 37°C schon nach 30 min keine weitere Zunahme der 2,4-Dinitrophenylhydrazon-Bildung erfolgte (siehe Abb. 2). Deshalb wurde für die Probandenserie die höhere Temperatur und ein Zeitraum von 30 min für die Detektionsreaktion gewählt. Als interner Standard diente *o*-Nitrophenol. Es war eine gute Auftrennung der Peaks von 2,4-Dinitrophenylhydrazin, 2,4-Dinitrophenylhydrazon und *o*-Nitrophenol möglich (Abb. 3). Die HPLC-Methode wurde wegen des höheren Zeitbedarfs im Vergleich zur Nash-Methode nicht direkt zur Phänotypisierung der Probanden, jedoch zur Klärung von Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der Geno- und Phänotypisierung verwendet (siehe Kapitel 3.1.3).

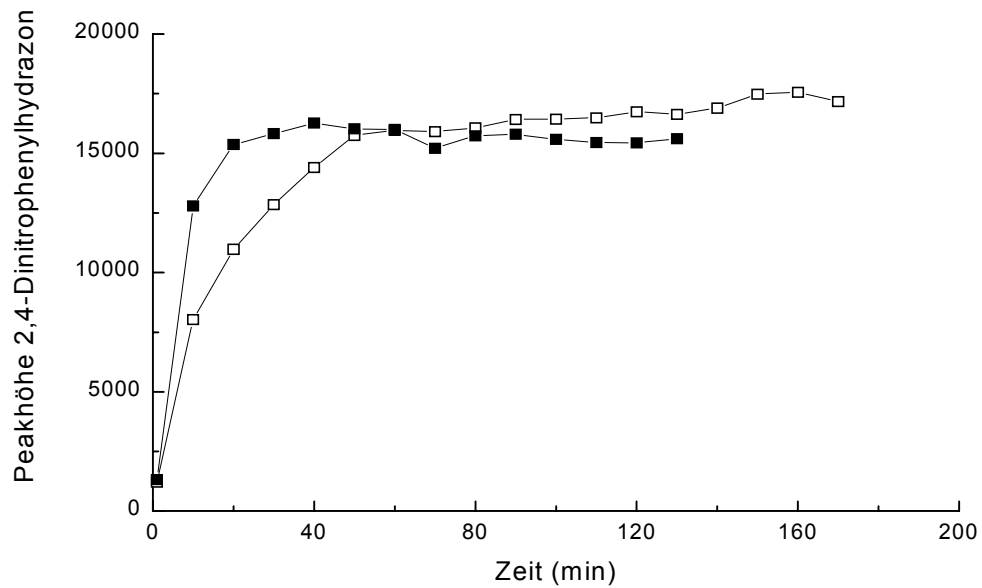


Abb. 2: Bildung von 2,4-Dinitrophenylhydrazon bei 25°C (-□-) und 37°C (-■-). Analyse zweier Gemische aus je 10,0 ml verdünnter Formaldehydlösung (100 µM) und 10,0 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung (100 µM) durch Inkubation bei 25°C bzw. 37°C. Entnahme von 1 ml und HPLC-analyse in den entsprechenden Zeitintervallen (n = 1).

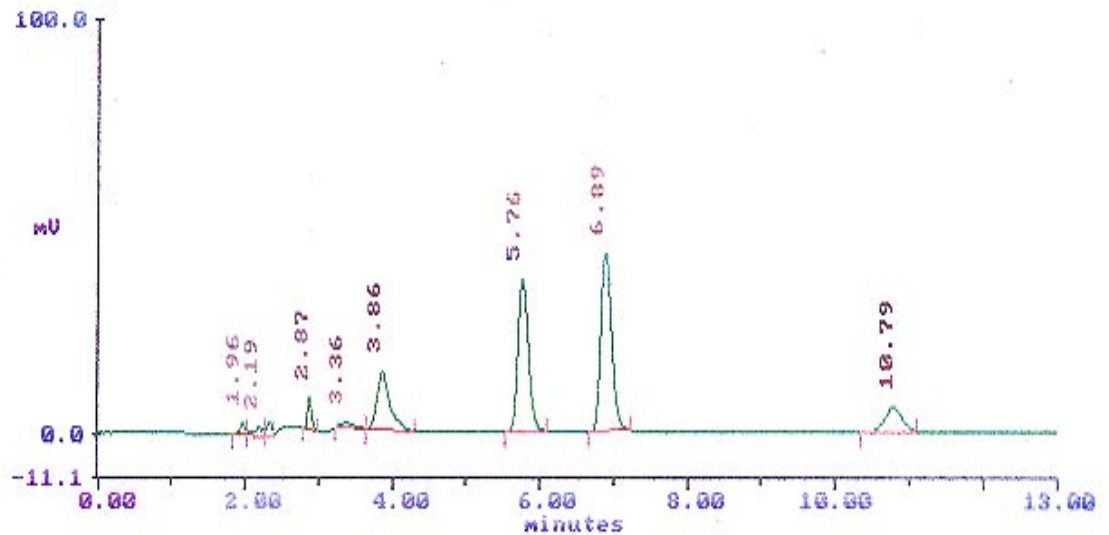


Abb. 3: HPLC-Analyse des Gemisches aus 2,4-Dinitrophenylhydrazon (RT: 5,76 min), internem Standard o-Nitrophenol (RT: 6,89 min) und 2,4-Dinitrophenylhydrazon (RT: 10,79 min).

Inkubationsbedingungen

Die Inkubationstemperatur lag bei 37°C. Nach einer fünfminütigen Temperierungsphase des Ansatzes wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet. Der Abbruch der enzymatischen Reaktion erfolgte nach 90 min durch Zugabe von 20%iger Trichloressigsäure (m/V).

Während Hallier *et al.* (1994) bei ihren GSTT1-1-Bestimmungen 1,8 ml Hämolysat in einem Gesamtvolumen von 7,8 ml Inkubationsansatz einsetzten, wurden bei den vorliegenden Untersuchungen im Interesse einer optimalen Verwendung der verfügbaren Probenmengen und einer kostengünstigen Durchführung der Phänotypisierung Ansatzvolumina von 1 ml verwendet.

Optimierung der Probenvorbereitung

In der Studie von Hallier *et al.* (1994) waren die Blutproben der Probanden unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert und das Blutplasma verworfen worden. Nach einem Waschschrift erfolgte die Lysis der Erythrozyten durch Zusatz von gleichen Volumenteilen destillierten Wassers. Für die vorliegenden Untersuchungen kamen Blutproben zur Anwendung, die nach der Entnahme bei - 80°C eingefroren worden waren. Da es bei der Probenvorbereitung einerseits auf vollständige Lysis der Erythrozyten und andererseits auf einen möglichst geringen Funktionsverlust des Enzyms durch Proteindenaturation ankommt, wurden verschiedene Verfahren mit weiteren Einfrier- und Auftauzyklen bzw. unter Einbeziehung des Zellaufschlusses durch Ultraschallbehandlung überprüft. Zwei Einfrier- und Auftauzyklen umfassten dabei jeweils das vollständige Auftauen der eingefrorenen Proben innerhalb von 60 min bei Raumtemperatur (25°C) sowie erneutes Einfrieren (60 min bei -80°C) und anschließendes Auftauen (60 min bei Raumtemperatur). Die Ergebnisse in Tab. 15 zeigen bereits bei zwei Einfrier- und Auftauzyklen ein Optimum, zusätzliche Behandlungen bieten keinen Vorteil.

Tab. 15: Reaktionsgeschwindigkeit der Formaldehydbildung bei verschiedenen Verfahren der Probenvorbereitung (1 ml-Ansatz, Dichlormethan: 100 mM, GSH: 4 mM/Ansatz, n = 2).

Verfahren der Probenvorbereitung	Reaktionsgeschwindigkeit (pmol Formaldehyd/min·µl)
zwei Einfrier- und Auftauzyklen	20,3
	20,3
vier Einfrier- und Auftauzyklen	18,2
	19,2
sechs Einfrier- und Auftauzyklen	19,6
	19,5
zwei Einfrier- und Auftauzyklen + 30 s Ultraschall (60 W/cm ²)	18,7
	16,0
zwei Einfrier- und Auftauzyklen + 60 s Ultraschall (60 W/cm ²)	18,8
	20,2

Optimierung der Enzymmenge

Da bei Enzymaktivitätsbestimmungen für eine vorgegebene Substratkonzentration im Messzeitraum eine proportionale Beziehung zwischen Enzymmenge und gebildeter Produktmenge bestehen muss, wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom HämolySATvolumen überprüft. Unter den gegebenen Bedingungen konnte bis 350 µl HämolySAT eine lineare Beziehung zwischen eingesetztem HämolySATvolumen und der Geschwindigkeit der Formaldehydbildung festgestellt werden (vgl. Abb. 4). Bei Verwendung von 500 µl HämolySAT ließ sich die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr steigern, da im Verhältnis zur Enzymmenge offensichtlich ein Mangel an Substrat bestand. In den weiteren Untersuchungen enthielten die 1 ml-Inkubationsansätze jeweils 125 µl HämolySAT.

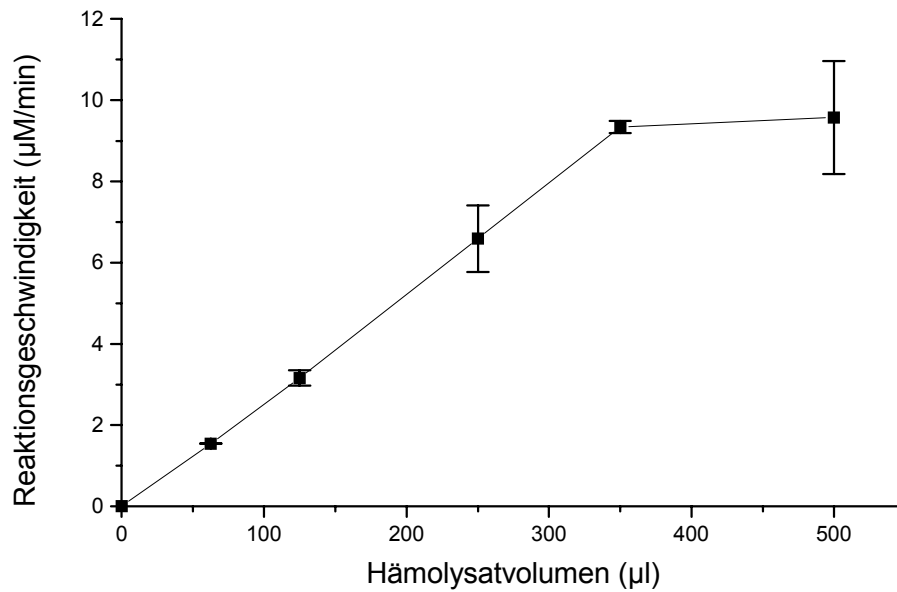


Abb. 4: Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Formaldehydbildung vom eingesetzten Hämolysatvolumen (62 mM Dichlormethan und 4 mM GSH in einem Ansatzvolumen von 1 ml, $n = 3$, $\bar{x} \pm R$).

Optimierung der Inkubationszeit

Die Messung der Zeitabhängigkeit der Formaldehydbildung ergab einen linearen Verlauf (Abb. 5), das heißt, bis zu einer Inkubationszeit von 180 min war die Reaktionsgeschwindigkeit unter den gegebenen Bedingungen konstant. Damit scheint die Gefahr der Denaturierung des Enzyms, auf die verschiedene Autoren (Liese *et al.*, 1988, Richterich und Colombo, 1978) bei Inkubationszeiten über 60 min verweisen, unter diesen Bedingungen nicht gegeben. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Produktbildung bei einem vertretbaren Zeitaufwand wurde im folgenden eine Inkubationszeit von 90 min gewählt.

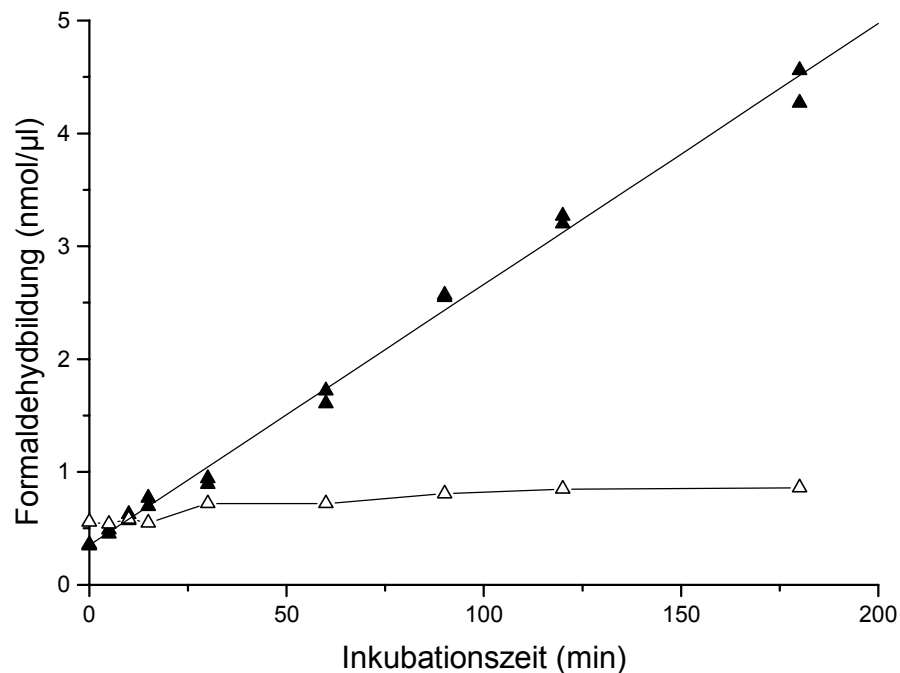


Abb. 5: Zeitabhängigkeit der spezifischen Formaldehydbildung (nmol/μl Hämolyt) im unbehandeltem (-□-) und hitzeinaktivierten (-□-) Hämolyt (1 ml-Ansätze mit 125 μl Hämolyt, 100 mM Dichlormethan und 4 mM GSH/Ansatz, n = 2; n = 1 bei hitzeinaktivierten Proben).

Optimierung der Substratkonzentration

Es war das Ziel der vorliegenden Untersuchungen, neben der Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten der GSTT1-1-vermittelten Umsetzung bei verschiedenen Substratkonzentrationen für jeden Probanden die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} zu berechnen. Durch Voruntersuchungen wurde zunächst der Substratkonzentrationsbereich eingegrenzt. In Abb. 6 ist beispielhaft die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration im Bereich bis 250 mM Dichlormethan dargestellt. Die Daten lassen sich annähernd durch eine hyperbolische Funktion beschreiben, so dass angenommen werden kann, dass die enzymatische Umsetzung einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt (Michaelis und Menten, 1913).

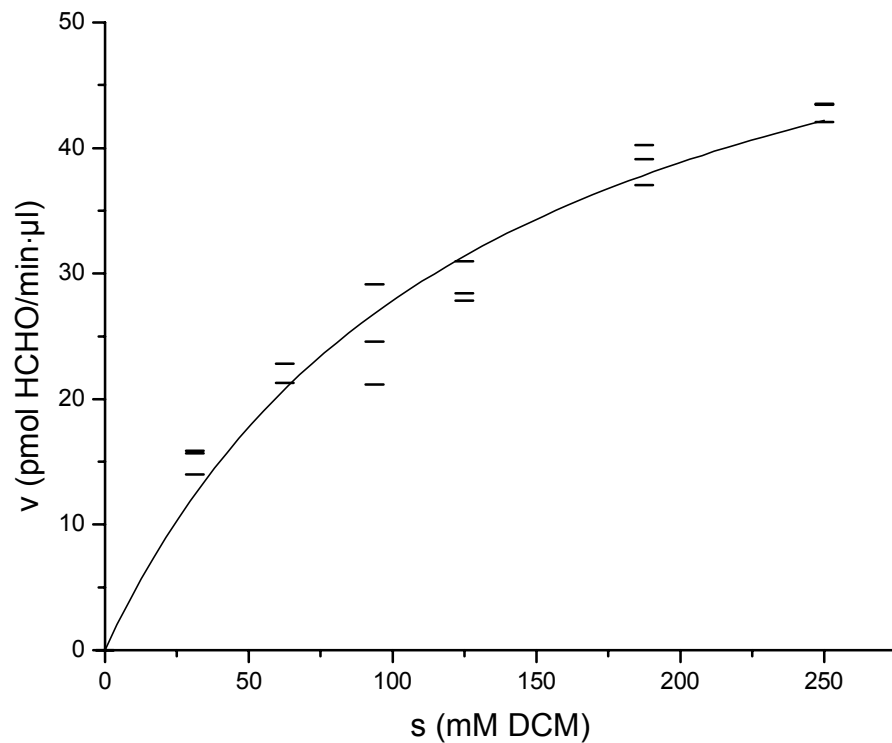


Abb. 6: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (v) von der Substratkonzentration (s) für die durch GSTT1-1 katalysierte Bildung von Formaldehyd aus Dichlormethan.

Die Voraussetzung für eine konstante Reaktionsgeschwindigkeit ist ein Substratüberschuß im Messzeitraum. Es wird empfohlen, dass während der Inkubationszeit nicht mehr als 20% des Substrats verbraucht werden (Richterich und Colombo, 1978). Da sich bei vorliegenden Untersuchungen aus 1 μmol Substrat 1 μmol Produkt bildete, kann aus der Produktmenge der Substratverbrauch im Messzeitraum berechnet werden. Unter der Voraussetzung der Stabilität des Substrats ist der Verbrauch innerhalb des Messzeitraums sehr gering (siehe Tab. 16). Damit kann bei den untersuchten Substratkonzentrationen über die Inkubationszeit von 90 min von einer annähernd konstanten Reaktionsgeschwindigkeit ausgegangen werden, so dass dieser Konzentrationsbereich für die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten als geeignet anzusehen ist. Für die Untersuchungen der Probandenproben wurde die Messung bei drei Substratkonzentrationen (31, 62 und 124 mM Dichlormethan) durchgeführt und die

Ergebnisse zur Phänotypisierung und zur näherungsweisen Bestimmung von K_m und V_{max} verwendet.

Tab. 16: Mittlerer Substratverbrauch im Inkubationszeitraum (90 min, 125 μ l Hämolytat, 4 mM GSH); verwendet wurden jeweils die Mittelwerte von Substrat- und Produktmenge ($n = 3$).

Stoffmenge (μ mol) Substrat im Ansatz	Stoffmenge (nmol) Produkt im Ansatz	Substrat- verbrauch (%)
31	171	0,55
62	248	0,40
93	281	0,30
124	327	0,26
186	436	0,23
250	484	0,19

Optimierung der Cosubstrat-Konzentration

In bisherigen Phänotypisierungsstudien mit Dichlormethan als Substrat wurden Konzentrationen des Cosubstrats Glutathion von 4 mM (Hallier *et al.*, 1994, Pemble *et al.*, 1994), 5 mM (Mainwaring *et al.*, 1996) bzw. 10 mM (Hallier *et al.*, 1993 Ahmed and Anders, 1978) im Ansatz verwendet. Zur Ermittlung der optimalen Glutathion-Konzentration für diese Studie wurden 1 ml-Ansätze mit Glutathion-Konzentrationen im Bereich 0,5 - 10 mM GSH/Ansatz hergestellt. Es zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen die Reaktionsgeschwindigkeit nicht linear mit steigender GSH-Konzentration zunimmt, sondern im Bereich 4 - 5 mM/Ansatz ein Optimum besitzt. Die in Abb. 7 dargestellte Funktion mit der Gleichung $y = 16,2x - 2,5x^2 + 0,1x^3 + 10,3$ wurde durch polynomische Regression dritten Grades an die Einzelwerte angepasst. Das Maximum der Kurve liegt bei einer Glutathion-Konzentration von 4,4 mM/Ansatz. Für die Untersuchungen wurde eine GSH-Konzentration von 4 mM/Ansatz verwendet.

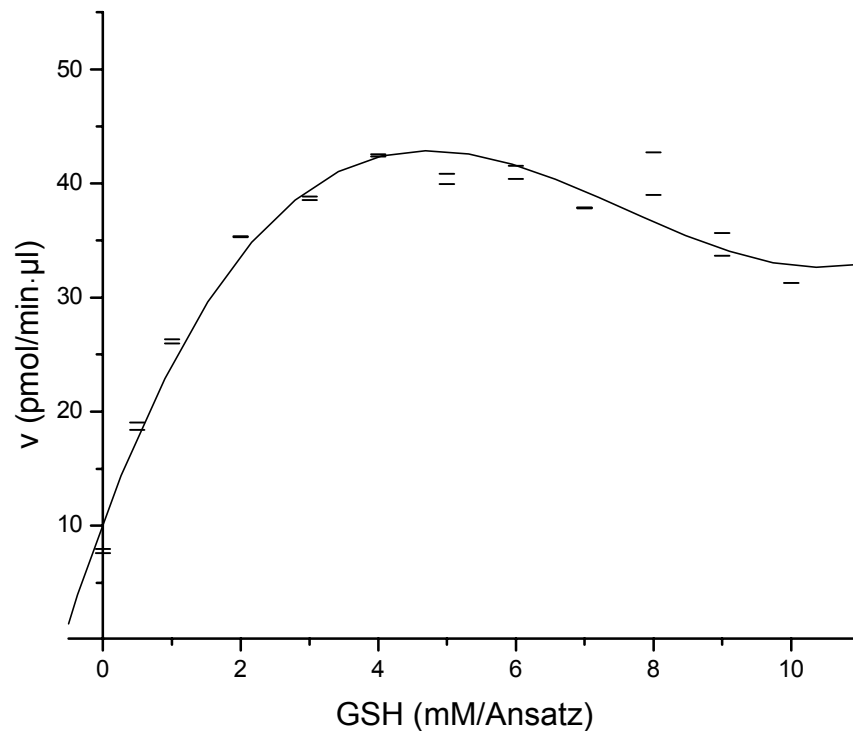


Abb. 7: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Glutathion-Konzentration bei einer Substratkonzentration von 124 mM, 90 min Inkubationszeit, 125 µl Hämolyt (n = 2).

Stabilität und Wiederfindungsrate des Formaldehyds

Stabilität. Als Akzeptanzkriterium für die Stabilität eines Analyten wird ein 90%iger Vertrauensbereich der Analysenergebnisse im Bereich von 90-110% der Ausgangskonzentration empfohlen (Shah *et al.*, 1992). Zur Überprüfung der Stabilität des Formaldehyds wurden 12 ml einer verdünnten, wässrigen Formaldehydlösung (3 mM) bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min wurde je 1 ml der Lösung entnommen und mit der Methode nach Nash analysiert. Der mittlere Formaldehydgehalt aller Lösungen lag bei 102,75% der Ausgangskonzentration (90% VB 102,3 – 103,2%). Demnach ist o.g. Bedingung erfüllt und die Stabilität des Formaldehyds unter Inkubationsbedingungen als ausreichend zu betrachten. Die Stabilität der kommerziell erworbenen Formaldehyd-Stammlösung (deklarerter Gehalt 37%) wurde über den

Messzeitraum hinweg dreimal jeweils in Zehnfachbestimmung iodometrisch bestimmt (Poethke und Kupferschmid, 1979). Bei dieser Methode wird Formaldehyd in alkalischer Lösung durch Iod quantitativ zu Ameisensäure oxidiert. Diese Oxidation wird durch das aus Iod und Alkalilauge gebildete Hypoiodit bewirkt. Nach dem Ansäuern entsteht aus nicht verbrauchtem Hypoiodit und Iodat wieder Iod, das nach dem Ansäuern mit Thiosulfat unter Verwendung von Stärke-Indikator zurücktitriert wird. Der Mittelwert der drei Bestimmungen im Messzeitraum (40,5%) wurde für die Erstellung der individuellen Kalibrierfunktionen zugrunde gelegt.

Wiederfindungsrate des Formaldehyds. Die Bestimmung der Wiederfindungsrate (WFR) eines Analyten kann Informationen über eventuelle Verluste, z. B. durch Extraktion oder Derivatisierung, oder über dessen Instabilität in der Probenmatrix liefern. Sie berechnet sich nach der Formel: $WFR(\%) = (\text{Signal bei Bestimmung im Inkubationsansatz} / \text{Signal bei Bestimmung in Pufferlösung}) \cdot 100\%$.

Eine WFR unter 100% ist akzeptabel, wenn sie bei allen Konzentrationen konstant ist und mit ausreichender Präzision bestimmt werden kann (Hartmann, 1994). Tab. 17 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der Wiederfindungsrate bei ausgewählten, über den Kalibrierbereich (vgl. Abb. 8) verteilten Proben. Die Ergebnisse zeigen, dass die Wiederfindungsrate relativ konstant ist. Die Präzision der Bestimmung der Wiederfindungsrate, ausgedrückt durch die relative Standardabweichung (s_{rel}), liegt unter 15% und ist damit als ausreichend zu betrachten (siehe auch folgenden Abschnitt *Präzisionskontrollen*).

Tab. 17: WFR des Formaldehyds in der Probenmatrix. Herstellung der Ansätze wie unter Kalibrierung (Kapitel 4.4.3) angegeben. Die WFR ist der Mittelwert aus $n = 3$ bzw. 6.

Formaldehyd-Konzentration (μM)	100	200	300	400	500
WFR (%)	73,6	70,4	74,5	74,9	76,9
s_{rel} (%)	1,6	4,7	2,1	2,9	0,7

Präzisionskontrollen

Die Präzision wird durch das Auftreten zufälliger Fehler beeinflusst. Die relative Standardabweichung (s_{rel}) ist ein Maß für die Impräzision. Kromidas *et al.* (1995)

empfehlen eine Kontrolle der Messpräzision (Präzision des Analysengerätes) vor der Kontrolle der Methodenpräzision. S_{rel} sollte dabei 1% möglichst nicht übersteigen. Neben internen Präzisionskontrollen (Kontrolle der Präzision bei Durchführung der Methode durch denselben Bearbeiter an einem Gerät) sind externe Präzisionskontrollen notwendig, falls die Methode von verschiedenen Bearbeitern und/oder an verschiedenen Messgeräten durchgeführt wird („Ringversuche“, Shah *et al.*, 1992).

Messpräzision. Die Präzision des verwendeten Fotometers wurde zu Beginn aller Untersuchungen durch zehnmaliges Vermessen einer verdünnten Formaldehydlösung (100 μ M) bestimmt. S_{rel} lag hier bei 1,36%; die Messpräzision wurde noch als ausreichend bewertet.

Methodenpräzision. Bei der Methodenpräzision unterscheidet man zwischen der Präzision innerhalb einer Serie von Messungen (serielle Präzision, *intra-assay variation*) und der Präzision für die Messungen identischer Proben an verschiedenen Tagen durch denselben Bearbeiter (zeitabhängige Präzision, *inter-assay variation*). Als Akzeptanzkriterium für die Präzision einer Methode gilt eine relative Standardabweichung von maximal 15% (Shah *et al.*, 1992).

Die serielle Präzision der Formaldehydbestimmung nach Nash wurde an drei Tagen bei drei verschiedenen Konzentrationen ($n = 6$ je Konzentration und Tag) ermittelt. Der Sollwert als bestmögliche Näherung an den wahren (richtigen) Wert wurde dabei durch iodometrische Bestimmung des Formaldehydgehaltes der verwendeten Stammlösung (40,5%, siehe oben) und drei unabhängige Einwaagen der Formaldehydlösung sichergestellt. Aus den in Tab. 18 dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass in keiner der untersuchten Serien das Akzeptanzkriterium überschritten wird. Damit ist die serielle Präzision der Methode als ausreichend zu betrachten. Die Bestimmung der zeitabhängigen Präzision der Methode nach Nash wird im Abschnitt *Qualitätssicherung während der Probenmessungen* beschrieben. Zusätzlich ist dort die zeitabhängige Präzision der Bestimmung der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit in einem selbst hergestellten Kontrollmaterial dargestellt.

Kontrolle der Richtigkeit der Formaldehydbestimmung

Die Kontrolle der Richtigkeit einer Methode erfolgt anhand des systematischen Fehlers. Definitionsgemäß ist die Unrichtigkeit die Abweichung des Analysenergebnisses vom Sollwert. Als Akzeptanzkriterium gilt, dass die mittlere relative Abweichung der Analysenergebnisse einer Mehrfachbestimmung ($n \geq 5$) vom Sollwert maximal $\pm 15\%$ betragen darf (Shah *et al.*, 1992). Während bei der Sollwertkonzentration von 50 μM Formaldehyd lediglich am ersten Tag die Akzeptanzgrenze überschritten wurde, erfüllen alle anderen Kontrollen das Richtigkeitskriterium (siehe Tab. 18).

Tab. 18: Kontrolle der seriellen Präzision und der Richtigkeit der Formaldehydbestimmung nach Nash ($n = 6$ je Konzentration und Tag).

Sollwert (μM Formaldehyd)	Tag	\bar{x} der Bestimmungen (μM Formaldehyd)	s	Serielle Präzision (s_{rel} in %)	Mittlere relative Abweichung vom Sollwert (%)
50,0	1	58,3	4,1	7,0	16,7
	2	45,3	3,2	7,1	-9,3
	3	47,1	1,4	3,0	-5,8
150,0	1	154,6	4,2	2,7	3,1
	2	151,5	0,6	0,4	1,0
	3	153,0	2,4	1,6	2,0
300,0	1	312,2	3,3	1,1	4,1
	2	306,6	4,4	1,4	2,2
	3	312,3	2,9	0,9	4,1

Spezifität der Formaldehydbestimmung

Eine Methode arbeitet spezifisch, wenn sie die zu bestimmende Komponente ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten erfasst (Kromidas *et al.*, 1995). Obwohl die Nash-Methode als relativ spezifisch für Formaldehyd gilt, muss davon ausgegangen werden, dass unter den gegebenen Bedingungen auch für wasserlösliche Bestandteile der Probenmatrix, die im Überstand nach Abzentrifugieren der gefällten Proteine (siehe Kapitel 4.4.3) vorhanden sind, eine Absorption bei 415 nm messbar ist. Hallier *et al.* (1994)

konnten in substratfreien Proben bei 415 nm eine Absorption messen, die sie als „Formaldehyd-background“ bezeichneten. Bei vorliegenden Untersuchungen wurden in substratfreien Ansätzen (Puffer anstelle Dichlormethan) individuell variierende „Leerwerte“ nach 90 min Inkubation festgestellt. Daher wurde in der Phänotypisierungs-Studie der Leerwert jedes Probanden von den Messwerten der regulären Inkubationsansätze subtrahiert.

Untersuchungen zur Kalibrierfunktion

Erstellung der Kalibrierfunktion. Die Kalibrierfunktion beschreibt den mathematischen Zusammenhang zwischen der Konzentration der Kalibrierproben und dem Analysensignal. Zur Erstellung der Kalibrierfunktion soll dieselbe Matrix verwendet werden wie für die zu analysierenden Proben. Nach Vorversuchen wurde für die Kalibrierfunktion der praktisch relevante Konzentrationsbereich von 50 - 400 μM Formaldehyd ausgewählt. Es wurden für die Konzentrationen 50, 100, 150, 300 und 400 μM Formaldehyd in substratfreien Ansätzen mit 125 μl Hämolyolat, 333 μl GSH-Lösung (4 mM/Ansatz) und TRIS-HCl-Puffer ad 1 ml jeweils neun Bestimmungen durchgeführt. Damit war die Empfehlung, wonach das Produkt aus der Anzahl der Kalibrierproben und der Wiederholbestimmungen pro Kalibrierprobe mindestens 24 betragen sollte, berücksichtigt (McDowall *et al.*, 1995). Die Herstellung der Ansätze ist in Kapitel 4.4.3 beschrieben. Abb. 8 zeigt die grafische Darstellung der Kalibrierfunktion.

Linearität. Zur Berechnung der Geradengleichung der Kalibrierfunktion kann die ungewichtete lineare Regressionsanalyse nur dann verwendet werden, wenn eine Linearität der Abhängigkeit von Konzentration und Signal der Kalibrierproben besteht sowie Homogenität der Varianzen (Homoskedastizität) über den Kalibrierbereich nachgewiesen wurde oder angenommen werden kann. Zur Beurteilung der Linearität können die grafische Darstellung, der Korrelationskoeffizient und die relative Abweichung der an Hand der Kalibrierfunktion berechneten Konzentrationen vom Sollwert herangezogen werden. Die grafische Darstellung in Abb. 8 lässt den Schluss zu, dass eine lineare Abhängigkeit des Analysensignals von der Konzentration des Analyten besteht. Die relative Abweichung der Konzentration einer Kalibrierprobe vom

entsprechenden Sollwert sollte unter 15% liegen (Shah *et al.*, 1992). Diese Bedingung ist im gewählten Kalibrierbereich erfüllt (Abb. 9). Der Korrelationskoeffizient sollte mindestens 0,95 betragen. Von einigen Autoren wird er als ungeeignet zur Beurteilung der linearen Abhängigkeit des Signals von der Konzentration angesehen (Shah *et al.*, 1992). Der Korrelationskoeffizient der vorliegenden Kalibrierfunktion ($r = 0,9987$) wird als ausreichend betrachtet. Das Problem der Ungleichheit der Varianzen (Heteroskedastizität) tritt eher bei Kalibrierbereichen über mehrere Zehnerpotenzen auf (Shah *et al.*, 1992). Aufgrund des geringen Umfanges des hier verwendeten Kalibrierbereichs kann von einer Homogenität der Varianzen ausgegangen werden. Die Geradengleichung der Kalibrierfunktion wurde deshalb durch ungewichtete lineare Regression ermittelt.

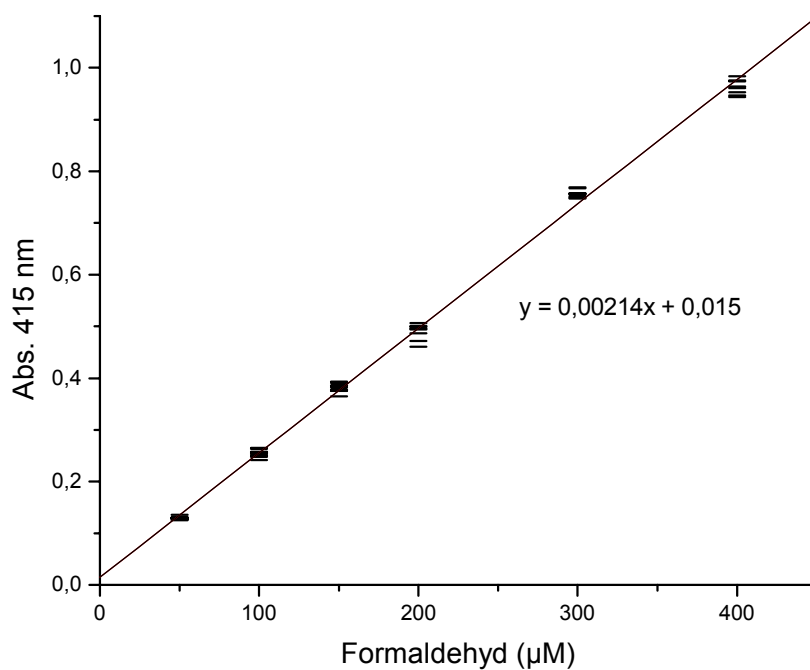


Abb. 8: Kalibrierfunktion für die Formaldehydbestimmung nach Nash (n = 9 je Konzentration).

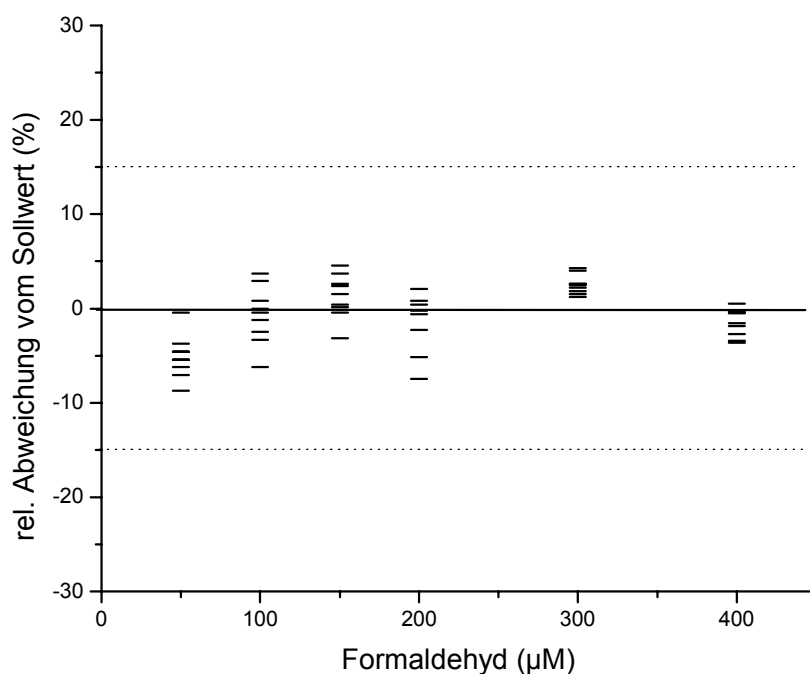


Abb. 9: Relative Abweichung der aus der Gleichung der Kalibrierfunktion berechneten Konzentrationen der Kalibrierproben (n = 9 je Konzentration) vom Sollwert. 15%-Akzeptanzgrenze

Bestimmungs- und Nachweisgrenze. Die Bestimmungsgrenze stellt diejenige Konzentration dar, bis zu der zuverlässige Analyseergebnisse gewonnen werden können. Sie wird definiert als die Konzentration des Analyten, welche ein Signal mit einer Impräzision (s_{rel}) von maximal 20% und einer relativen Abweichung vom Sollwert zwischen 80 und 120% liefert (Shah *et al.*, 1992). Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze der Methode nach Nash wurden Ansätze mit Formaldehyd-Konzentrationen von 5, 10, 20, 25, 50, 100, 150 und 200 μM (jeweils $n = 6$) analysiert. Bei einer Formaldehyd-Konzentration von 50 μM wurde o.g. Kriterium erfüllt (s_{rel} : 16,2%, rel. Abweichung vom Sollwert: 11,0%). Die Bestimmungsgrenze für Formaldehyd liegt demnach unter den gegebenen Bedingungen bei 50 μM (4,4 pmol/min· μl Hämolysat). Diese Konzentration wurde als niedrigste Kalibrierkonzentration verwendet. Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze für Formaldehyd bei der HPLC-Methode wurden Proben in Analogie zur Nash-Methode hergestellt und analysiert. Bei allen Formaldehyd-Konzentrationen unter 50 nmol/ml waren keine Peaks zur Retentionszeit von 2,4-Dinitrophenylhydrazon nachweisbar. Die relative Standardabweichung als Maß für die Präzision lag bei 50 μM Formaldehyd bei 15,4% und bei 100 μM bei 15,0%. Die Bestimmungsgrenzen der beiden Methoden sind somit identisch.

Unter der Nachweisgrenze wird das Analysensignal verstanden, das noch vom Leerwert unterschieden werden kann. Sie liegt in der Regel bei der Hälfte bis zu einem Drittel der Bestimmungsgrenze. Als Nachweisgrenze für Formaldehyd bei der Bestimmung nach Nash wurde diejenige Konzentration definiert, die dem Signal des Leerwertes plus dreifacher Standardabweichung entsprach (Long and Winefordner, 1983). Es wurden aus jeweils 125 μl Hämolysat, 333 μl GSH-Lösung (4 mM/Ansatz) und Pufferlösung ad 1 ml zehn Leerwerte hergestellt und mit der Methode nach Nash analysiert. Zum Mittelwert der Signale wurde das Dreifache der Standardabweichung addiert und die Summe mit Hilfe der mitgeführten Kalibrierfunktion in die Formaldehyd-Konzentration umgerechnet. Es ergab sich eine Nachweisgrenze von 21 μM Formaldehyd (1,9 pmol/min· μl Hämolysat).

Qualitätssicherung während der Probenmessungen

Zeitabhängige Präzision. Bei Anwendung einer validierten Methode muss gesichert werden können, dass sie nach den während der Validierung erarbeiteten Spezifikationen arbeitet. Zu diesem Zweck wird empfohlen, in jeder Analysenserie neben den Kalibrierproben und den zu bestimmenden Proben unbekannter Konzentration auch eine Anzahl von Proben bekannter Konzentration, sogenannte Qualitätskontrollproben, mitzuführen (Shah *et al.*, 1992). Bei vorliegenden Untersuchungen wurden zur Qualitätssicherung während der Probenmessungen an jedem Messtag aus substratfreien Ansätzen drei Qualitätskontrollproben mit Formaldehyd-Konzentrationen von 200, 400 und 600 μM mitgeführt. Aus den Ergebnissen der Messungen ließ sich die zeitabhängige Präzision der Methode nach Nash bestimmen (siehe Tab. 19). Die relative Standardabweichung als Maß für die Schwankungen der Analysenergebnisse liegt jeweils unter 5%. Damit ist die zeitabhängige Präzision der Methode nach Nash als ausreichend zu bewerten.

Tab. 19: Zeitabhängige Präzision der Nash-Methode. Bestimmung der Formaldehydbildung in Ansätzen mit 125 μl Hämolyt, GSH 4 mM/Ansatz, Formaldehydlösung und Puffer ad 1 ml an 29 Messtagen.

	Formaldehyd-Konzentration (μM)		
	200	400	600
\bar{x} (n = 29)	198,5	396,2	597,0
s	8,1	12,7	16,3
s_{rel} (%)	4,1	3,2	2,7

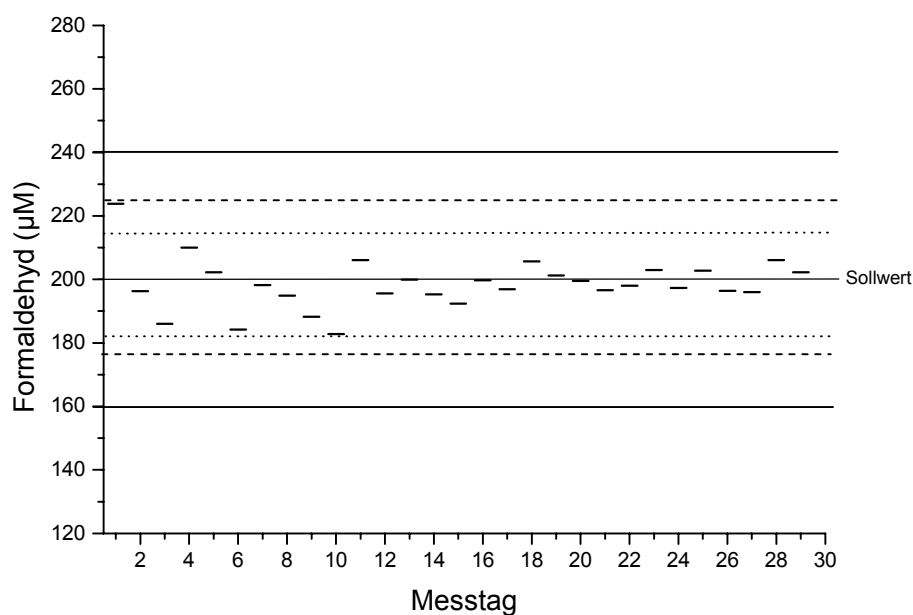
Durch das Mitführen von Enzymkontrollproben sollte überprüft werden, ob während der Lagerung der Proben Veränderungen der Enzymaktivität aufgetreten sind. Es wurde Hämolyt eines hoch aktiven Probanden (durch vorherige Genotypisierung und Phänotypisierung gesichert) in 500 μl -Portionen aufgeteilt und bei -80°C aufbewahrt. Die Inkubation der Enzymkontrollproben erfolgte mit 4 μl Dichlormethan (n = 2). Die relative Standardabweichung als Maß für die zeitabhängige Präzision der Messungen der Enzymkontrollproben lag bei 8,4% ($\bar{x} \pm s = 30,9 \pm 2,6 \text{ pmol/min}\cdot\mu\text{l}$) und damit unter der Akzeptanzgrenze von 15%.

Damit ist sichergestellt, dass keine problematischen Veränderungen der Enzymaktivität durch die Lagerung der Proben aufgetreten sind.

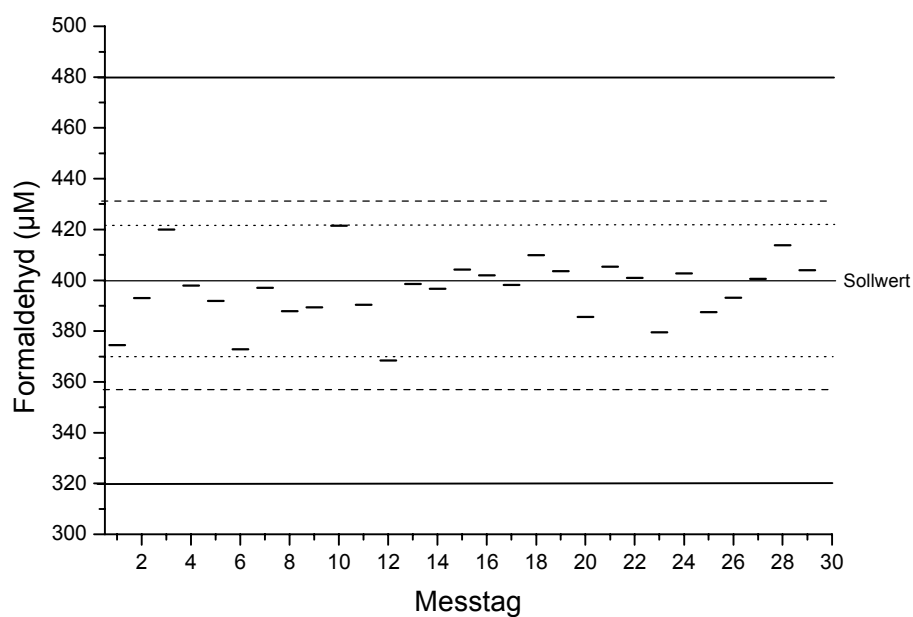
Qualitätsregelkarten. Die Ergebnisse der Messungen der Qualitätskontrollproben können in Qualitätsregelkarten eingetragen werden, um systematische Fehler leichter zu erkennen. Sie enthalten den Sollwert der Analyten-Konzentration mit den Akzeptanzgrenzen für die Richtigkeit sowie Warn- und Kontrollgrenzen. Als Akzeptanzgrenze für die Richtigkeit sind allgemein $\pm 20\%$ akzeptiert. Die obere und untere Warngrenze berechnen sich aus dem Sollwert \pm dem Doppelten der Standardabweichung der Einzelproben, die Kontrollgrenzen aus dem Sollwert \pm dem Dreifachen der Standardabweichung. Die Ergebnisse einer Analysenserie sind zu verwerfen, wenn alle zugehörigen Qualitätskontrollproben die Kontrollgrenzen über- bzw. unterschreiten. Außerdem werden noch folgende Ereignisse als Außer-Kontroll-Situationen gewertet:

- sieben aufeinanderfolgende Werte auf einer Seite der Zentrallinie
- sieben aufeinanderfolgende Werte mit aufsteigender bzw. abfallender Tendenz
- zwei von drei Werten außerhalb der Warngrenzen (Causey *et al.*, 1990, Shah *et al.*, 1992)

In Abb. 10a - c sind die Regelkarten mit den Messungen der Qualitätskontrollproben während der Phänotypisierungs-Studie dargestellt. Alle Proben lagen innerhalb des geforderten Akzeptanzbereiches für die Richtigkeit von $\pm 20\%$ des Sollwertes, größtenteils sogar unter 5% (siehe Tab. 20). Die Kontrollgrenzen wurden nur an einem Messtag im oberen Konzentrationsbereich geringfügig überschritten. Die beiden anderen Qualitätskontrollproben dieser Serie lagen jedoch innerhalb der Grenzen, so dass die Ergebnisse dieses Messtages nicht verworfen werden mussten. Weitere Außer-Kontroll-Situation (siehe oben) wurden nicht registriert. Es kann davon ausgegangen werden kann, dass während der gesamten Messungen keine unzulässig hohen systematischen Fehler bei der Anwendung der Nash-Methode aufgetreten sind.

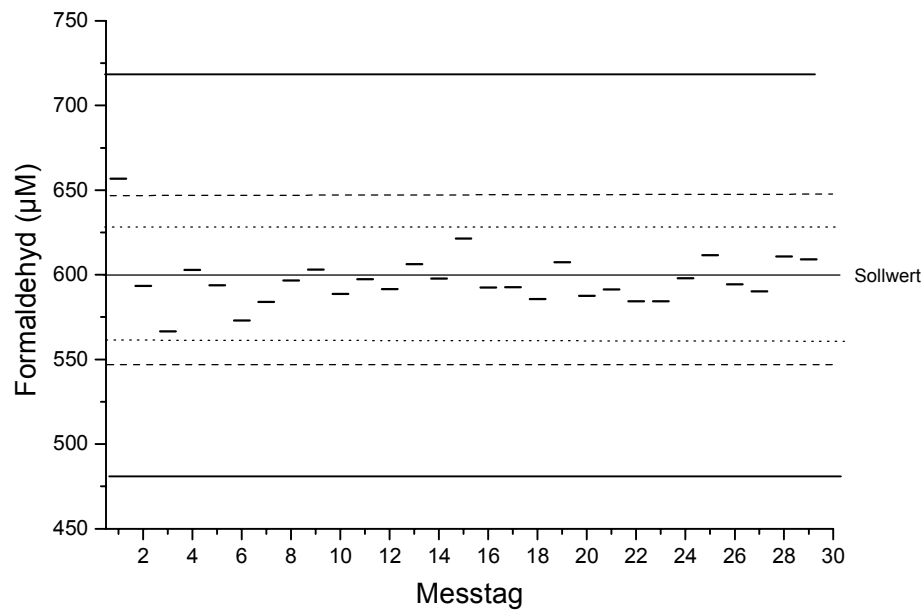


(a)



(b)

Abb. 10a – c, siehe auch folgende Seite: Qualitätsregelkarten zur Kontrolle von zeitabhängiger Präzision und Richtigkeit der Formaldehydbestimmung bei drei Konzentrationen: (a) 200 µM; (b) 400 µM; (c) 600 µM; (— Akzeptanzgrenze für die Richtigkeit: Sollwert \pm 20%; Warngrenze: Sollwert \pm zweifache Standardabweichung, berechnet aus den Einzelproben; Kontrollgrenze: Sollwert \pm dreifache Standardabweichung).



(c)

Tab. 20: Prozentuale Abweichung der Qualitätskontrollproben der Formaldehydbestimmung nach Nash vom Sollwert

Konzentration (µM Formaldehyd)	Anzahl der Qualitätsproben (n = 29)	
	Abweichung < ± 5%	Abweichung < ± 10%
200	24 (83%)	28 (97%)
400	24 (83%)	29 (100%)
600	27 (93%)	29 (100%)

Phänotypisierung der Probanden: Ergebnisse und Diskussion

Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit. Nach Abschluss der Optimierung und Validierung erfolgte die Phänotypisierung der Probanden in Inkubationsansätzen mit 125 µl Hämolytat, 333 µl GSH (4 mM/Ansatz), Substratkonzentrationen von 31, 62 und 124 mM Dichlormethan und TRIS-HCl-Puffer, 20 mM, pH 7,5 ad 1 ml. Für jeden Probanden wurde eine Dreifachbestimmung je Substratkonzentration sowie eine Doppelbestimmung der substratfreien Leeransätze („Leerwerte“) durchgeführt. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in pmol Formaldehyd pro Minute pro µl Hämolytat berechnet. Abb. 11 zeigt die

Häufigkeitsverteilung der Reaktionsgeschwindigkeiten der 140 Probanden bei einer Substratkonzentration von 124 mM Dichlormethan sowie den Probit-Plot. Anhand der grafischen Darstellung sind drei Phänotypen voneinander abgrenzbar: eine Gruppe von Individuen, in deren Hämolsat eine Reaktionsgeschwindigkeit nicht messbar war bzw. im Bereich der Nachweisgrenze lag; eine weitere Gruppe mit intermediärer sowie eine dritte Gruppe mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit.

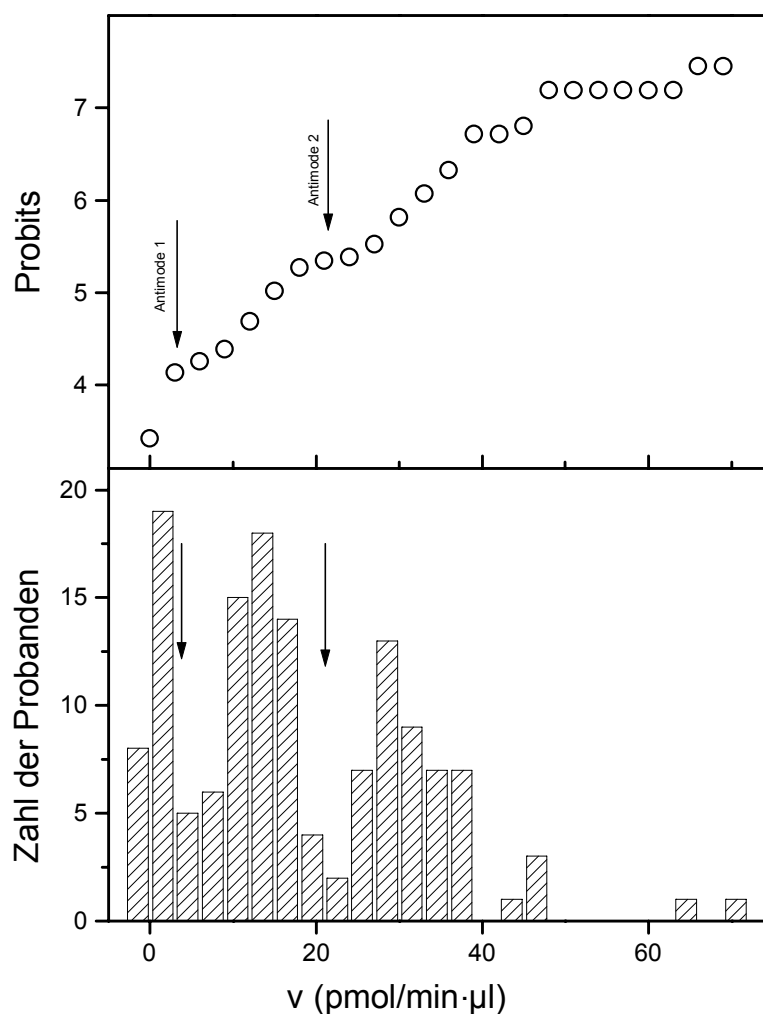


Abb. 11: Häufigkeitsverteilung der Reaktionsgeschwindigkeiten im Hämolsat von 140 Probanden bei der GSTT1-1-katalysierten Umsetzung von Dichlormethan (Substratkonzentration: 124 mM).

Probanden mit einer Reaktionsgeschwindigkeit unterhalb 3 pmol Formaldehyd/min·µl Hämolsat bei 124 mM Dichlormethan wurden als funktionell

inaktiv (defizient) betrachtet. Abb. 12 zeigt beispielhaft die Formaldehydbildung in Ansätzen mit Hämolytat eines defizienten Probanden im Vergleich zum Leerwert des gleichen Hämolytats im Inkubationszeitraum. Die Häufigkeit der Enzymdefizienz betrug in der untersuchten Population 19,3% (n = 27).

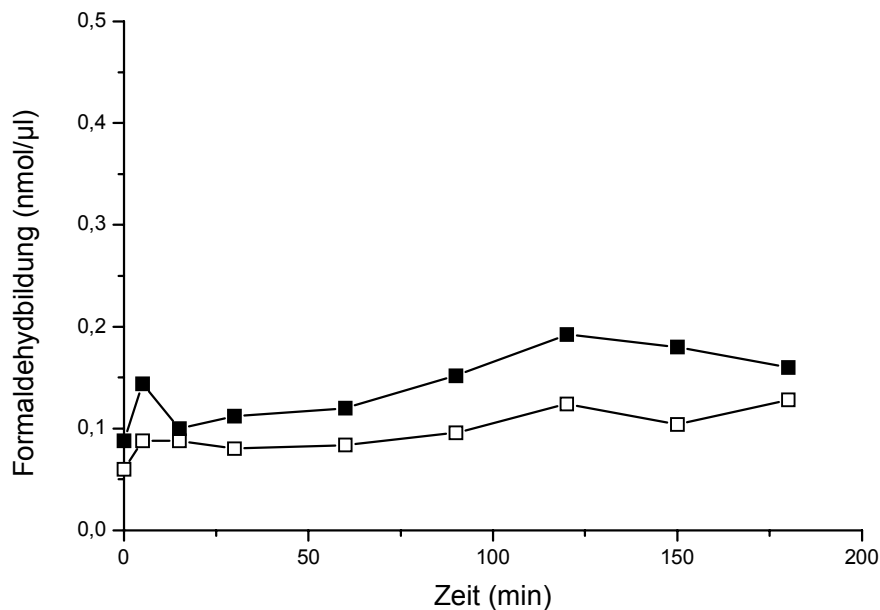


Abb. 12: Formaldehydbildung in Ansätzen mit 124 mM Substrat (-■-) und Leerwerte in substratfreien Ansätzen (-□-) mit Hämolytat eines GSTT1-1-defizienten Probanden (jeweils n = 1).

Bei den GSTT1-1-aktiven Probanden (n = 113) war im Hämolytat von 63 Individuen (45,0%) eine intermediäre Reaktionsgeschwindigkeit messbar. Sie lag bei dieser Substratkonzentration im Bereich 3 - 22 pmol/min·μl Hämolytat. 50 Probanden (35,7%) besaßen eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit im Bereich 23 – 70 pmol/min·μl Hämolytat. Vergleicht man die Mediane der Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden aktiven Phänotypen, so lag die mittlere Reaktionsgeschwindigkeit aller Individuen mit dem hoch aktiven Phänotyp beim 2,4fachen der Reaktionsgeschwindigkeit der Individuen mit dem intermediären Phänotyp (Median 30,7 bzw. 12,6 pmol/min·μl Hämolytat). Auffällig ist die sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeit im Hämolytat zweier Probanden (Abb. 11), die mit

66 bzw. 70 pmol/min·µl Hämolysat mehr als das Doppelte der mittleren Reaktionsgeschwindigkeit der hoch aktiven Individuen betrug. Eine mögliche Erklärung dafür ist das Vorliegen einer Genduplikation, wie sie bereits bei einem anderen GST-Isoenzym, GSTM1, nachgewiesen werden konnte (McLellan *et al.*, 1997). Bei den Messungen mit 31 und 62 mM Dichlormethan war eine übereinstimmende Zuordnung der Probanden zu den drei Phänotypen möglich (siehe Tab. 21).

Tab. 21: Zuordnung der hinsichtlich GSTT1-1 phänotypisierten Probanden (n = 140) zu den drei Phänotypen.

Substrat-konzentration (mM Dichlormethan)	Phänotyp	Reaktions- geschwindigkeit (pmol/min·µl)	Zahl der Individuen und Häufigkeit des Phänotyps (%)
31	defizient	< 2	27 (19,3)
	intermediär aktiv	2 – 8	63 (45,0)
	hoch aktiv	8 – 29	50 (35,7)
62	defizient	< 2	26 (18,6)
	intermediär aktiv	2 – 17	64 (45,7)
	hoch aktiv	15 – 52	50 (35,7)
124	defizient	< 3	27 (19,3)
	intermediär aktiv	3 – 22	63 (45,0)
	hoch aktiv	23 – 70	50 (35,7)

Die Formaldehydbildung bei der 31 mM-Substratkonzentration war jedoch teilweise sehr gering; bei 13 Probanden lag sie unterhalb der Bestimmungsgrenze. Für drei dieser Probanden trifft das auch auf die 62 mM-Substratkonzentration zu. Aus dieser Tatsache kann geschlussfolgert werden, dass eine Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten im Hämolysat der GSTT1-1-aktiven Probanden bei höheren Substratkonzentrationen, beispielsweise 62, 124 und 248 mM Dichlormethan, günstiger gewesen wäre, da dann die entstehende Formaldehydmenge bei o.g. Individuen nicht im Bereich der Bestimmungsgrenze gelegen hätte. Höhere Substratkonzentrationen als 124 mM waren deshalb nicht in Betracht gezogen worden, weil Hallier *et al.* (1994) bei Dichlormethan-

Konzentrationen über 120 mM einen Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet hatten, der auf eine Substrathemmung zurückzuführen sein könnte.

Da bisher nur wenige Phänotypisierungsstudien hinsichtlich GSTT1-1, insbesondere mit dem Substrat Dichlormethan, durchgeführt wurden, sind kaum Vergleiche mit den Ergebnissen anderer Autoren möglich. Pemble *et al.* (1994) bestimmten im Hämolytat von vier Probanden die GSTT1-1-katalysierte Formaldehydbildung aus Dichlormethan. Sie lag im Bereich 15 – 18 pmol/min·mg Hb (keine Angabe der Dichlormethan-Konzentration). Hallier *et al.* (1994) bestimmten die Reaktionsgeschwindigkeit der Formaldehydbildung im Hämolytat von sieben Individuen. Sie lag bei 48 mM Dichlormethan im Bereich von 4 – 18 pmol/min·mg Hb. In einer Studie von Warholm *et al.* (1994), bei der erstmalig drei Phänotypen voneinander abgegrenzt worden waren, wurde mit dem Substrat Methylchlorid eine Enzymdefizienz bei 11,1% der Probanden, eine intermediäre Umsetzungsgeschwindigkeit bei 46,1% und eine hohe bei 42,8% der Individuen bestimmt (n = 208). Die mittlere Reaktionsgeschwindigkeit aller Individuen mit dem hoch aktiven Phänotyp lag etwa beim Doppelten der Reaktionsgeschwindigkeit der Individuen mit dem intermediären Phänotyp, wie es auch in vorliegenden Untersuchungen annähernd der Fall war.

Bestimmung der enzymkinetischen Parameter. Für eine korrekte Bestimmung von V_{\max} und K_m müssen eine Reihe von Bedingungen erfüllt sein. Es wird empfohlen, mindestens 10 Substratkonzentrationen über den in Vorversuchen ermittelten Konzentrationsbereich zu verteilen. Es werden Intervalle von $0,2 \cdot K_m$, $0,5 \cdot K_m$, K_m , $2 \cdot K_m$ und $5 \cdot K_m$ oder $K_m/4$, $K_m/3$, $K_m/2$, K_m , $2 \cdot K_m$, $4 \cdot K_m$ und $8 \cdot K_m$ vorgeschlagen. Als günstigster Bereich zur genauen Ermittlung von K_m wird der Bereich zwischen 20%iger bis 80%iger Sättigung des Enzyms betrachtet (Suelter, 1990). Bei vorliegender Studie waren Voruntersuchungen zur Ermittlung des optimalen Substrat-Konzentrationsbereichs jedes einzelnen Probanden aus zeitlichen Gründen nicht möglich und auch nicht beabsichtigt. Deshalb konnten nur die Reaktionsgeschwindigkeiten bei den drei zur Phänotypisierung der Probanden verwendeten Substratkonzentrationen zur näherungsweisen Berechnung der enzymkinetischen Parameter herangezogen werden.

Als Modelle zur Analyse der gewonnen Messdaten existieren neben der hyperbolischen Funktion eine Reihe von linearisierten Transformationen der Michaelis-Menten-Gleichung, deren grafische Darstellung optisch die Richtigkeit des enzymkinetischen Mechanismus überprüfbar macht. Die am häufigsten verwendeten Darstellungen sind der Lineweaver-Burk-Plot, der Hanes-Plot und der Eadie-Hofstee-Plot. Welches dieser Modelle am besten zur Berechnung von K_m und V_{max} aus den experimentell ermittelten Daten geeignet ist, sollte jedoch nicht subjektiv bestimmt werden. Für eine objektive Betrachtung wird eine Residuenanalyse vorgeschlagen (Mannervik, 1982). Die Ausgleichsgeraden bei den linearisierten Darstellungen sollten durch gewichtete lineare Regression ermittelt werden. Je nach Art der verwendeten Wichtungsfaktoren ist es dadurch einerseits möglich, die unterschiedliche Varianz der Messwerte zu berücksichtigen. Andererseits kann die Verzerrung der Messfehler, die nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz durch die Bildung der Reziproken von Substratkonzentration (s) und/oder Reaktionsgeschwindigkeit (v) entsteht, korrigiert werden (Lasch, 1987).

Bei den vorliegenden Untersuchungen war durch den geringen Umfang der für jeden Probanden vorliegenden Messdaten eine statistische Auswertung nicht möglich. K_m und V_{max} konnten nur näherungsweise bestimmt werden. Nach Lineweaver und Burk (1934) wurden das Reziproke der Reaktionsgeschwindigkeit ($1/v$) gegen das Reziproke der entsprechenden Substratkonzentration ($1/s$) aufgetragen (Abb. 13). Aus der Gleichung der nach ungewichteter linearer Regression erhaltenen Geraden der Form $1/v = 1/V_{max} + K_m/V_{max} \cdot 1/S$ wurden K_m und V_{max} berechnet. Die Gerade mit dem Anstieg K_m/V_{max} schneidet die Abszisse bei $-1/K_m$ und die Ordinate bei $1/V_{max}$.

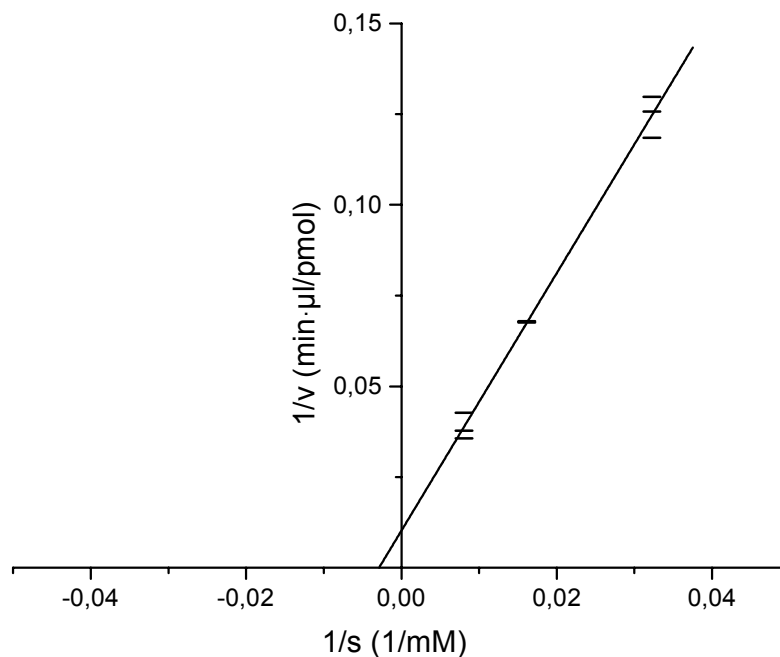


Abb. 13: Darstellung der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit $1/v$ eines GSTT1-1-aktiven Probanden in Abhängigkeit von der reziproken Substratkonzentration $1/s$ nach Lineweaver-Burk (ungewichtete lineare Regression der Einzelwerte, $n = 3$).

Die Variabilität der enzymkinetischen Parameter innerhalb der untersuchten Population sind in Abb. 14 und Abb. 15 dargestellt. Die K_m -Werte der GSTT1-1-aktiven Individuen lagen im Bereich zwischen 33 und 468 mmol/l. Bei Verwendung des Tests nach Kolmogoroff-Smirnoff (siehe Kapitel 4.5) konnte kein signifikanter Unterschied zur Normalverteilung festgestellt werden ($p > 0,05$).

Wegen der Normalverteilung der K_m -Werte sind Mutationen, die Veränderungen der Aminosäurestruktur des aktiven Zentrums des Enzyms und damit eine veränderte Affinität zum Substrat zur Folge haben, relativ unwahrscheinlich. Punktmutationen, wie sie beispielsweise bei *GSTM1* vorhanden sind (Widersten *et al.*, 1991) und damit bisher unbekannte *GSTT1*-Allelvarianten können jedoch nicht ausgeschlossen werden

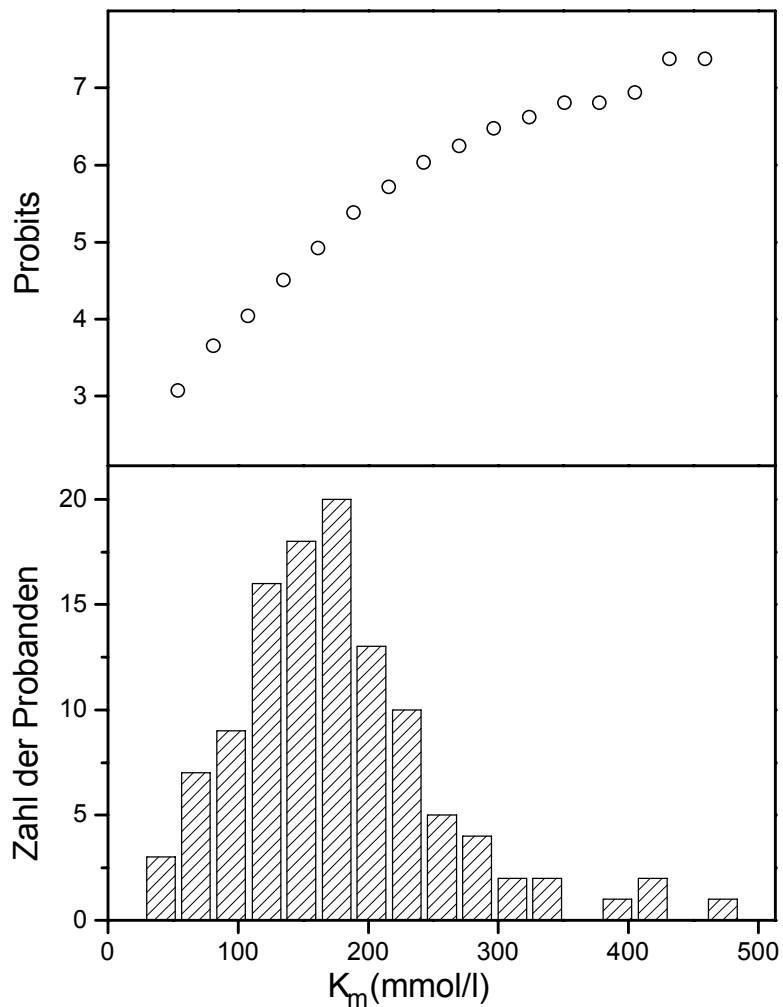


Abb. 14: Häufigkeitsverteilung der K_m -Werte der GSTT1-1-aktiven Probanden der Studie ($n = 113$).

Die V_{\max} -Daten der GSTT1-1-aktiven Individuen lagen im Bereich 5 – 149 pmol/min· μ l Hämolsat (Abb. 15). Die Ergebnisse zeigen eine bimodale Verteilung mit einem Antimode bei 54 pmol/min· μ l Hämolsat. Dabei lagen die V_{\max} -Werte von fünf Probanden, die aufgrund der Reaktionsgeschwindigkeiten bei den drei Substratkonzentrationen zu den Individuen mit intermediärer Aktivität gerechnet worden waren, über diesem Wert. In bisherigen Phänotypisierungsstudien sind Angaben zu enzymkinetischen Parametern der Individuen einer Population selten zu finden. Hallier *et al.* (1994) ermittelten bei Inkubation von Hämolsat eines

Probanden mit zehn verschiedenen Dichlormethan-Konzentrationen (10 – 200 mM) einen V_{\max} -Wert von 180 pmol/min·mg Hb und einen K_m -Wert von 60 mmol/l.

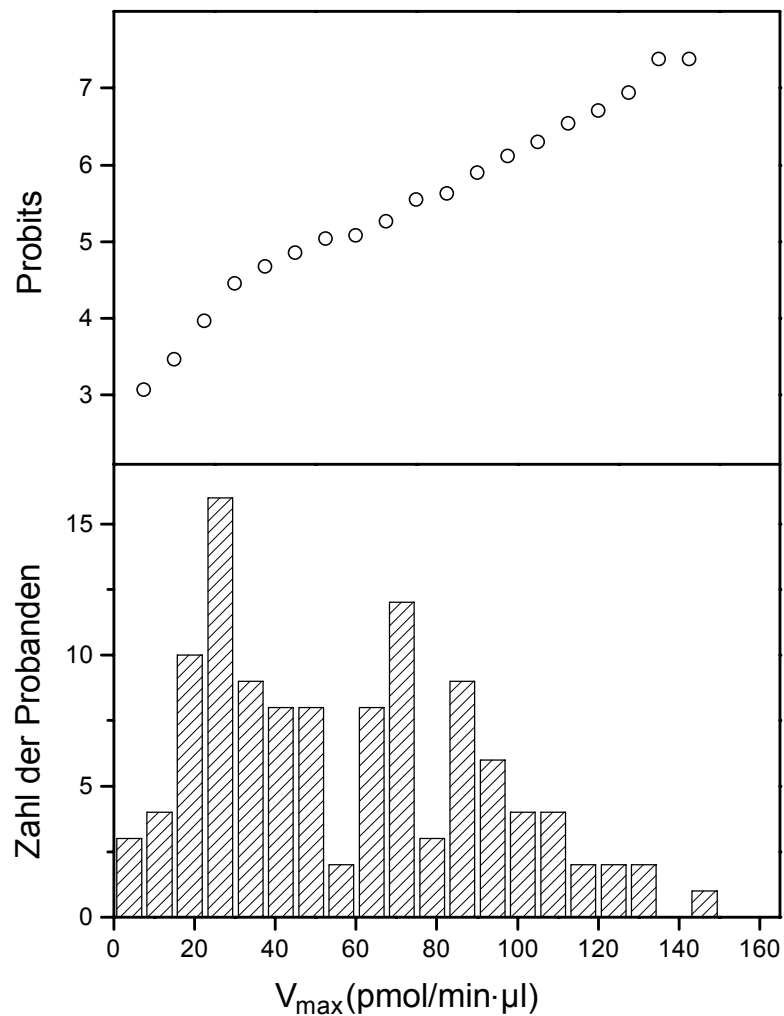


Abb. 15: Häufigkeitsverteilung der V_{\max} -Werte der GSTT1-1-aktiven Probanden (n = 113).

3.1.3 Vergleich und Diskussion der Ergebnisse der Geno- und Phänotypisierung der Probanden hinsichtlich der Glutathion-S-Transferase T1-1

Im Hämolysat von 140 zufällig ausgewählten, gesunden deutschen Probanden mit bekanntem *GSTT1*-Genotyp wurde eine Phänotypisierung hinsichtlich GSTT1-1 mit dem spezifischen Substrat Dichlormethan vorgenommen. Bei 27 Individuen (19,3%) war keine bzw. eine unterhalb der Nachweisgrenze stattfindende Umsetzung des Substrats nachweisbar. Es bestand eine 100%ige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Genotypisierung, wonach bei diesen Probanden eine homozygote *GSTT1*-Gendeletion und damit der Genotyp *GSTT1*0/0* vorlag.

Bei 113 Probanden (80,7%) war mittels Genotypisierung mindestens ein *GSTT1*A*-Allel identifiziert worden. Mit Hilfe der Phänotypisierung konnten in dieser Gruppe zwei Phänotypen voneinander abgegrenzt werden; 45,0% der Individuen waren unter den gegebenen Bedingungen intermediär, 35,7% der Individuen hoch aktiv. Damit bestand der Vorteil der Phänotypisierung darin, eine trimodale Verteilung der GSTT1-1-Aktivität nachweisen zu können. Da die mittlere Reaktionsgeschwindigkeit aller Individuen mit dem hoch aktiven Phänotyp etwas mehr als das Doppelte der Reaktionsgeschwindigkeit der Probanden mit dem intermediären Phänotyp betrug (Mediane 30,7 bzw. 12,6 pmol/min·µl Hämolysat), liegt wahrscheinlich ein Gen-Dosis-Effekt bedingt durch eine Codominanz der Allele *GSTT1*0* und *GSTT1*A* vor. Demnach sind Probanden mit einer mittleren GSTT1-1-Aktivität heterozygot und Probanden mit einer hohen Aktivität homozygot hinsichtlich des *GSTT1*A*-Allels. Mit der mathematischen Gleichung der Hardy-Weinberg-Regel wurden unter Verwendung der durch Genotypisierung ermittelten Häufigkeit des *GSTT*0/0*-Genotyps die Häufigkeiten der beiden anderen Genotypen berechnet. Die Gleichung $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ mit $p + q = 1$ diente der Berechnung der erwarteten Allelfrequenzen, wobei p hier die Frequenz des defizienten und q die des aktiven Allels darstellen sollen. Aus der durch Genotypisierung ermittelten Häufigkeit des *GSTT1*0/0*-Genotyps ($p^2 = 0,193$) wurden p und q berechnet ($q = 1 - p = 0,561$). Die Häufigkeit der heterozygoten

Individuen berechnete sich entsprechend aus $2pq = 0,492$. Unter Verwendung des χ^2 -Tests konnte kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen der erwarteten Verteilung der Genotypen und den durch Phänotypisierung ermittelten Häufigkeiten der Phänotypen gefunden werden (Tab. 22).

Tab. 22: Genotyp- und Phänotyp-Häufigkeiten der GSTT1-1-Studie im Vergleich mit Hardy-Weinberg's Theorem.

Genotyp	Häufigkeit des Genotyps nach Genotypisierung	Häufigkeit des Phänotyps nach Phänotypisierung	Erwartungswert nach Hardy-Weinberg
<i>GSTT1*0/0</i>	0,193	0,193	0,193
<i>GSTT1*A/0</i>	0,807	0,450	0,492
<i>GSTT1*A/A</i>		0,357	0,315

Aus der Anwendbarkeit der Hardy-Weinberg-Regel kann allgemein angenommen werden, dass sich die Population im Gleichgewichtszustand befindet, d.h. beispielsweise kein Selektionsdruck auf sie einwirkt (Hennig, 1995). Die in Tab. 22 dargestellten Ergebnisse unterstützen im speziellen die Hypothese, dass es sich bei den hoch aktiven Individuen um homozygote Träger des *GSTT1*A*-Allels und bei den intermediär aktiven um Heterozygote, d.h. Individuen mit dem Genotyp *GSTT1*A/0* handelt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Wiebel *et al.* (1999) bekräftigen die Hypothese der Codominanz der beiden *GSTT1*-Allele. Bei paralleler Phänotypisierung und Genotypisierung von 29 Mitgliedern einer Familie (drei Generationen) konnte mittels semiquantitativer PCR der *GSTT1*A/0*-Genotyp vom *GSTT1*A/A*-Genotyp differenziert werden. Die *GSTT1*-1-Enzymaktivität der Träger des *GSTT1*A/A*-Genotyps war doppelt so groß wie die der Träger des *GSTT1*A/0*-Genotyps.

Die HPLC-Methode kam bei vorliegenden Untersuchungen nur zur Klärung einer Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Geno- und Phänotypisierung zur Anwendung. Im Hämolysat eines Probanden, bei dem mittels Genotypisierung eindeutig ein *GSTT1*-spezifisches Amplifikat identifiziert worden war, konnte zunächst keine Umsetzung von Dichlormethan bestimmt werden. Bei wiederholter

Phänotypisierung, die zusätzlich zur Nash-Methode unter Verwendung der HPLC-Methode durchgeführt wurde, wurde schließlich in Übereinstimmung mit dem Genotyp eine enzymatische Formaldehydbildung nachgewiesen. Der zunächst veranschlagte höhere Zeitbedarf für die HPLC-Methode dürfte bei entsprechender Automatisierung der Analyse durch Verwendung eines automatischen Probengebers nicht die entscheidende Rolle spielen. Dagegen müsste vor Verwendung der HPLC-Methode zur Phänotypisierung eines größeren Probandenkollektivs geprüft werden, ob das Produkt 2,4-Dinitrophenylhydrazon über einen längeren Messzeitraum, je nach Kapazität des Probengebers bis zu 12 Stunden, stabil ist.

Die Grenzen der hier verwendeten Methode zur Genotypisierung der Probanden liegen darin, dass lediglich das Vorhandensein von mindestens einem *GSTT1**A-Allel nachgewiesen werden konnte. Eine Differenzierung zwischen heterozygoten und homozygoten Trägern war zunächst nicht möglich. Von Sprenger *et al.* (2000) wurde kürzlich eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, die *GSTT1*-Gendeletion detaillierter zu charakterisieren. Durch PCR-mapping stellten die Autoren fest, dass das *GSTT1*-Gen von zwei 18kb-Regionen (mit HA3 und HA5 bezeichnet) mit hoher Homologie ihrer Nukleotidsequenzen (90%) begrenzt ist. Im Falle der *GSTT1*-Deletion entsteht durch Fusion dieser beiden Genabschnitte ein neuer Abschnitt H0, der sich von HA3 und HA5 nur in wenigen Nukleotiden unterscheidet. Diese neuen Erkenntnisse ermöglichten die Entwicklung einer PCR-Methode, bei der die Gendeletion nicht durch die Abwesenheit eines PCR-Produkts wie bei der herkömmlichen Methode, sondern durch den Nachweis eines 1460 bp-Amplifikats diagnostiziert wird. Ein 466 bp-Amplifikat zeigt das Vorhandensein eines *GSTT1**A-Allels an. Damit konnten erstmalig die heterozygoten Träger von *GSTT1**A durch Nachweis zweier PCR-Produkte identifiziert werden (vgl. Tab. 23).

Tab. 23: PCR-Produkte der drei *GSTT1*-Genotypen bei der Methode nach Sprenger *et al.* (2000).

Genotyp	<i>GSTT1</i> *0/0	<i>GSTT1</i> *A/0	<i>GSTT1</i> *A/A
PCR-Produkte (bp)	1460	466, 1460	466

Von den im Rahmen der vorliegenden Studie phänotypisierten Probanden wurden 130 mit dieser neuentwickelten Methode erneut genotypisiert. Die Korrelation zwischen dem *GSTT1*0/0*-Genotyp und dem enzymdefizienten Phänotyp wurde bestätigt. Zusätzlich konnte bis auf wenige Ausnahmen (keine Übereinstimmung bei neun Individuen) bei den Probanden mit intermediärer Reaktionsgeschwindigkeit der *GSTT1*A/0*-Genotyp und bei Probanden mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit bei der Umsetzung von Dichlormethan der *GSTT1*A/A*-Genotyp diagnostiziert werden. Damit wird die Hypothese der Codominanz der beiden *GSTT1*-Allele erneut bestätigt.

Zusätzlich zu einem Gen-Dosis-Effekt muss auch der Einfluss von Faktoren in Betracht gezogen werden, die induzierend oder hemmend auf die Enzymaktivität wirken können. Die Problematik der Induktion und Hemmung von *GSTT1-1* bietet noch vielfältige Forschungsmöglichkeiten. Eine Induzierbarkeit des humanen Isoenzym ist denkbar, da ein solcher Effekt bei den verwandten Klasse-Theta-Enzymen der Ratte (*rGSTT1-1*, *rGSTT2-2*) bereits nachgewiesen werden konnte. Die *rGSTT1-1* im Rattenmagen konnte beispielsweise durch Cumarin und Alpha-Tocopherol, das Enzym der Rattenleber u.a. durch Cumarin und Phenobarbital sowie das Enzym des Rattendickdarms durch nichtsteroidale Antirheumatika wie beispielsweise Indometacin, Piroxicam und Acetylsalicylsäure induziert werden (van Lieshout *et al.*, 1998a, 1998b, Sherratt *et al.*, 1998). Mit der kombinierten Anwendung der Genotypisierungs-Methode von Sprenger *et al.* (2000) und einer Phänotypisierungs-Methode könnte in zukünftigen epidemiologischen Studien die Bedeutung von *GSTT1-1* als Risikofaktor für verschiedene Erkrankungen besser eingeschätzt werden.

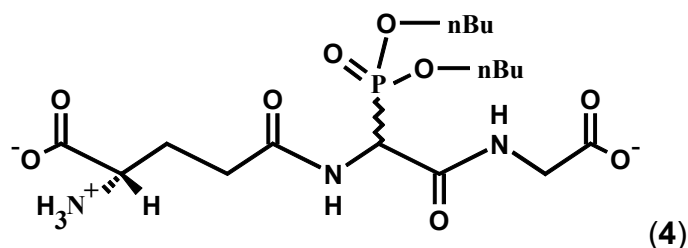
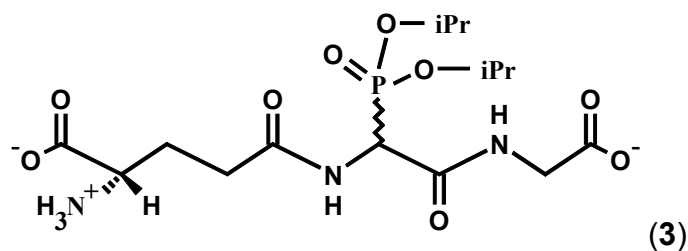
Hinsichtlich der *GSTT1*-Gendeletion bestehen nach bisherigen Erkenntnissen große interethnische Unterschiede (vgl. Tab. 4). In den asiatischen Bevölkerungsgruppen ist der *GSTT*0/0*-Genotyp stark verbreitet, die Häufigkeit seines Auftretens lag in den bisherigen Studien zwischen 58 und 64%. In den europäischen Bevölkerungsgruppen tritt nach den bisher vorliegenden Daten die *GSTT1*-Gendeletion viel seltener auf. Allerdings erscheint es möglich, dass auch zwischen einander ethnisch nahestehenden Bevölkerungsgruppen signifikante

Unterschiede bestehen. Bei Anwendung des χ^2 –Tests unterscheidet sich die Defizienz von 11,1% (95% VB 6,6 - 16,8%), die in einer Population von 208 schwedischen Individuen durch Phänotypisierung festgestellt wurde, signifikant ($p = 0,032$) von der in vorliegender Arbeit mittels Phänotypisierung ermittelten Häufigkeit von 19,3% (95% VB 12,1 – 27,7%). Beim Vergleich der eigenen Daten mit der in einer deutschen Population von 40 Individuen bestimmten Defizienz-Häufigkeit von 15% (95% VB 4,3 – 31,4%, Kempkes *et al.*, 1996) konnte dagegen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es sind weitere Studien in verschiedenen anderen europäischen Bevölkerungsgruppen notwendig, um diesbezüglich zu sicheren Aussagen kommen zu können. Es wird jedoch deutlich, dass bei epidemiologischen Studien die genaue Kenntnis der ethnischen Herkunft der Individuen von großer Bedeutung ist.

3.1.4 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen mit potentiellen Inhibitoren und Substraten der Glutathion-S-Transferase T1-1

Phosphonsäurediester des Glutathions

In Untersuchungen von Kunze (1996, siehe auch Kapitel 2.1.3) wurde das Cosubstrat Glutathion als Leitstruktur zur Entwicklung von GST-Inhibitoren, die als Modulatoren der Zytostatikaresistenz dienen könnten, verwendet. Neben anderen erwiesen sich dabei die Verbindungen (S)- γ -Glutamyl-(2RS)-2-amino-(di-iso-propoxy-phosphinyl)-acetyl-glycin (**3**) und (S)- γ -Glutamyl-(2RS)-2-amino-(di-n-butoxy-phosphinyl)-acetyl-glycin (**4**), in denen die SH-Funktion von GSH durch Phosphonsäurediester substituiert ist, als potentielle Inhibitoren verschiedener, aus Schweinegeweben isolierter GST-Isoenzyme.



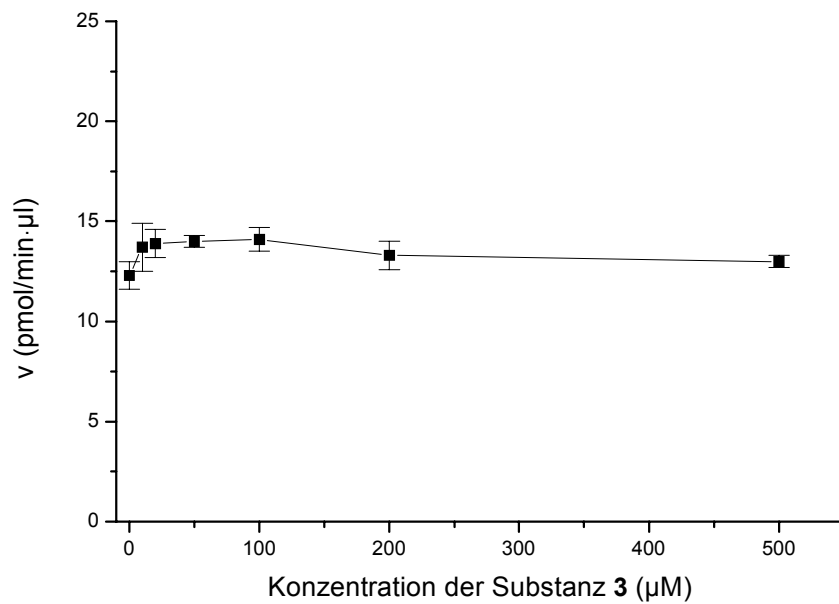
Der Di-iso-propyl-phosphonsäureester (**3**) und der Di-n-butyl-phosphonsäureester (**4**) zeigten bei GSTs der Klasse Alpha eine kompetitive Hemmung gegenüber Glutathion, wobei **4** stärker wirksam war als **3**. Bei den GSTs der Klassen Mu und Pi wurde dagegen für beide Substanzen ein gemischter nicht-kompetitiver Hemmtyp nachgewiesen. Für die aus humaner Plazenta isolierte GSTP1-1

wurden IC_{50} -Werte von 64 μM für **3** bzw. 21 μM für **4** bestimmt (Kunze, 1996).

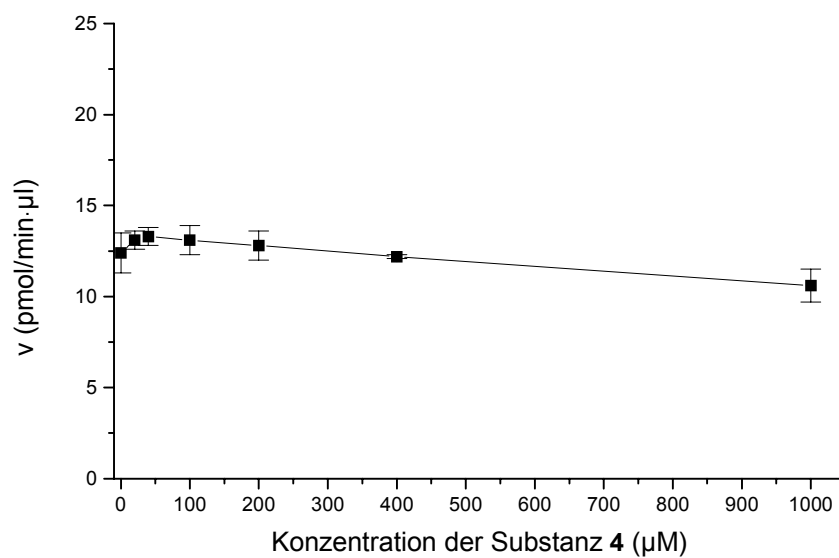
Bei vorliegenden Untersuchungen sollte überprüft werden, ob diese beiden Substanzen auch auf die GSTT1-1 der humanen Erythrozyten inhibitorisch wirken. Das Ziel bestand zunächst darin, durch Variation der Inhibitorkonzentrationen im Bereich 10 μM - 1 mM die IC_{50} zu ermitteln. Abb. 16 zeigt für beide Substanzen die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration an potentielltem Inhibitor. Eine erwartete Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu den Ansätzen ohne potentiellen Inhibitor konnte nicht beobachtet werden. Wegen der begrenzten Verfügbarkeit der Substanzen im Untersuchungszeitraum wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

In weiterführenden Studien wäre der nächste Schritt die Variation der GSH-Konzentration. Bei den hier dargestellten Versuchsergebnissen war eine GSH-Konzentration von 4 mM gewählt worden, wie sie auch als Optimum für die Phänotypisierung der Probanden hinsichtlich GSTT1-1 verwendet worden war. In Untersuchungen von Kunze (1996) wurde eine kompetitive Hemmung der GSTs der Klasse Alpha im Bereich 0,125 - 4 mM GSH festgestellt. Für die Hemmwirkung auf GST-Isoenzyme der Klassen Mu und Pi waren jedoch niedrigere GSH-Konzentrationen (0,125 - 1 mM) relevant.

Sollte auch bei diesen Untersuchungen kein Hemmeffekt der o.g. Substanzen nachweisbar sein, wäre eine Isoenzympezifität der potentiellen Inhibitoren denkbar. Diese könnte z. B. mit der von anderen GSTs abweichenden Struktur des aktiven Zentrums erklärbar sein. Während bei Isoenzymen der Klassen Alpha ein Arginin-Rest (Arg¹⁵) und bei GSTs der Klassen Mu und Pi ein Tyrosin-Rest der *G-site* bei der Aktivierung des Glutathions eine wichtige Rolle spielt, wird im Falle der GST Theta die Funktion der GSH-Aktivierung wahrscheinlich von einem Serin-Rest der GSH-Bindungsstelle übernommen (Tan *et al.*, 1995, Wilce *et al.*, 1996). Die Substanzen **3** und **4** könnten bezüglich ihrer Anlagerung an die *G-site* sterisch behindert sein (Kunze, persönliche Mitteilung).



(a)



(b)

Abb. 16: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit im Hämolyat eines Probanden von der Konzentration an potentielltem Inhibitor; (a) Substanz **3**, (b) Substanz **4** (1 ml-Ansatz mit 125 μl Hämolyat, 4 mM GSH und 124 mM Dichlormethan, n = 3 je Konzentration, $\bar{x} \pm R$).

Tacrin

Neuere epidemiologische Daten (ausführlich dargestellt in Kapitel 2.1.4) lassen eine Schutzfunktion von GSTT1-1 bei der Behandlung von Alzheimer-Patienten mit dem Arzneistoff Tacrin (9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridin, Cognex[®]) in dem Sinne vermuten, dass reaktive Tacrin-Metaboliten entgiftet bzw. ihre Bildung behindert werden kann. Tacrin selbst ist aufgrund seiner Struktur wahrscheinlich kein GSTT1-1-Substrat. Um diese Hypothese zu sichern, sollte ein möglicher Einfluss von Tacrin auf die Umsetzung von Dichlormethan durch GSTT1-1 getestet werden.

Bei einer Dosierung von 80 - 200 mg Tacrin pro Tag über zwei Wochen werden ein bis zwei Stunden nach Applikation maximale Plasmakonzentrationen von 0,09 - 0,26 μM erreicht (Wagstaff and McPavish, 1994). Bei vorliegenden Untersuchungen wurden zunächst Inkubationsansätze wie bei der Phänotypisierung der Probanden mit 124 mM Dichlormethan und Tacrin-Puffer-Lösungen im mikromolaren Bereich hergestellt. Es waren jedoch keine Hemmeffekte auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Dichlormethan-Umsetzung nachweisbar. Der Einfluss verschiedener Tacrin-Konzentrationen im millimolaren Bereich (0 - 160 mM Tacrin) bei einer Substratkonzentration von 124 mM ist in Abb. 17 dargestellt. Zur Bestimmung der IC_{50} als derjenigen Konzentration des Hemmstoffes, die die Enzymaktivität unter Standardbedingungen um 50% senkt, wurde Hämolyat eines Probanden mit Tacrin-Puffer-Lösungen in den Konzentrationen 7,5, 15, 30 und 75 mM Tacrin versetzt. Nach Substratzugabe erfolgt die Inkubation unter denselben Bedingungen wie bei der Phänotypisierung der GSTT1-1 mit den Substratkonzentrationen 31, 62 und 124 mM Dichlormethan. Nach Berechnung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{max}) der ungehemmten und der gehemmten Reaktionen ergab sich eine IC_{50} von 12 mM Tacrin.

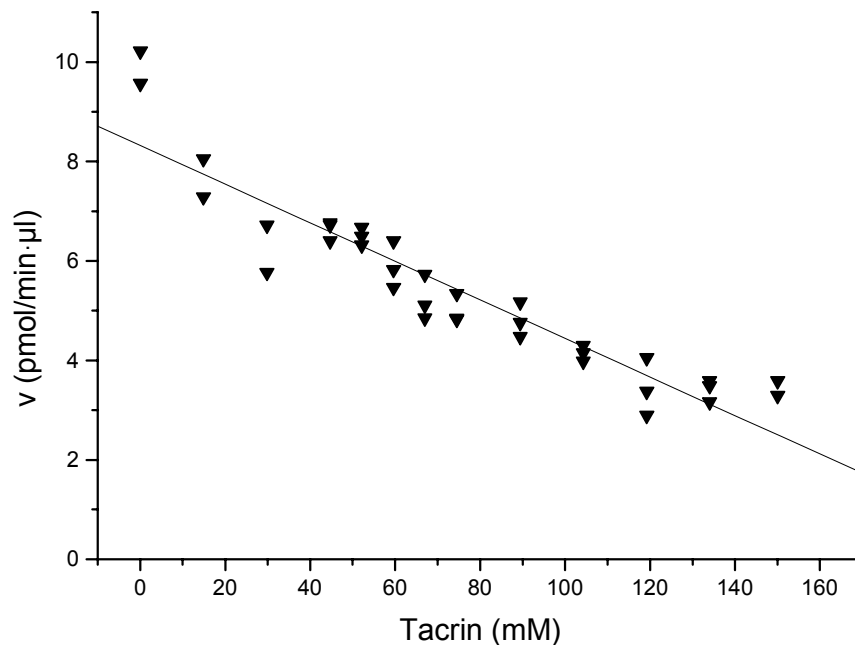


Abb. 17: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Tacrin-Konzentration bei einer Dichlormethan-Konzentration von 124 mM (n = 2 bzw.3)

Abb. 18 zeigt die doppelt reziproke Darstellung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen. Bei zwei Tacrin-Konzentrationen (7,5 und 30 mM) verläuft die durch lineare Regression an die Mittelwerte der Messungen angepasste Gerade parallel zur Geraden der ungehemmten Reaktion, das heißt, sowohl K_m als auch V_{max} sind im Vergleich zur ungehemmten Reaktion verändert. Dies lässt auf eine unkompetitive Hemmung des Enzyms im untersuchten Bereich schließen, die auf einer Wechselwirkung des Inhibitors mit dem Enzym-Substrat-Komplex beruht. (Schellenberger, 1989).

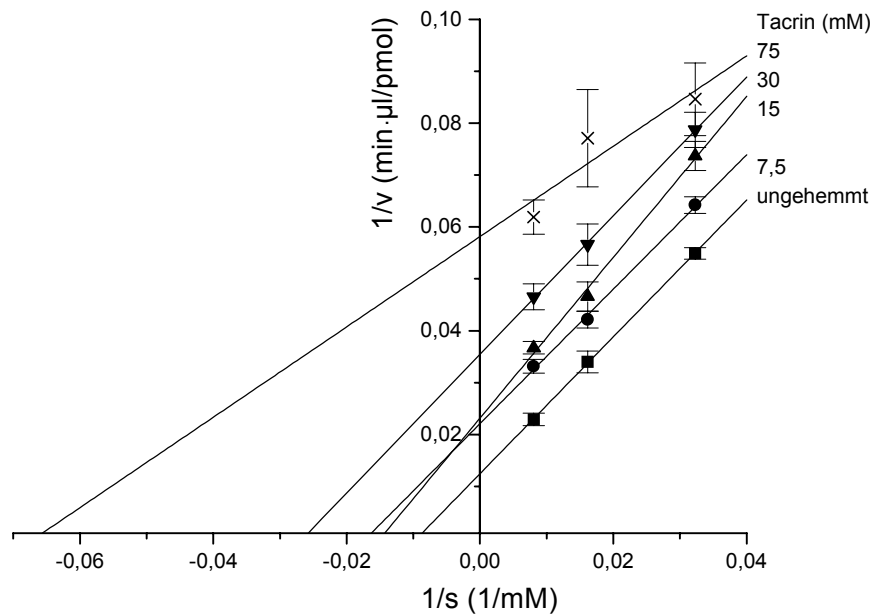
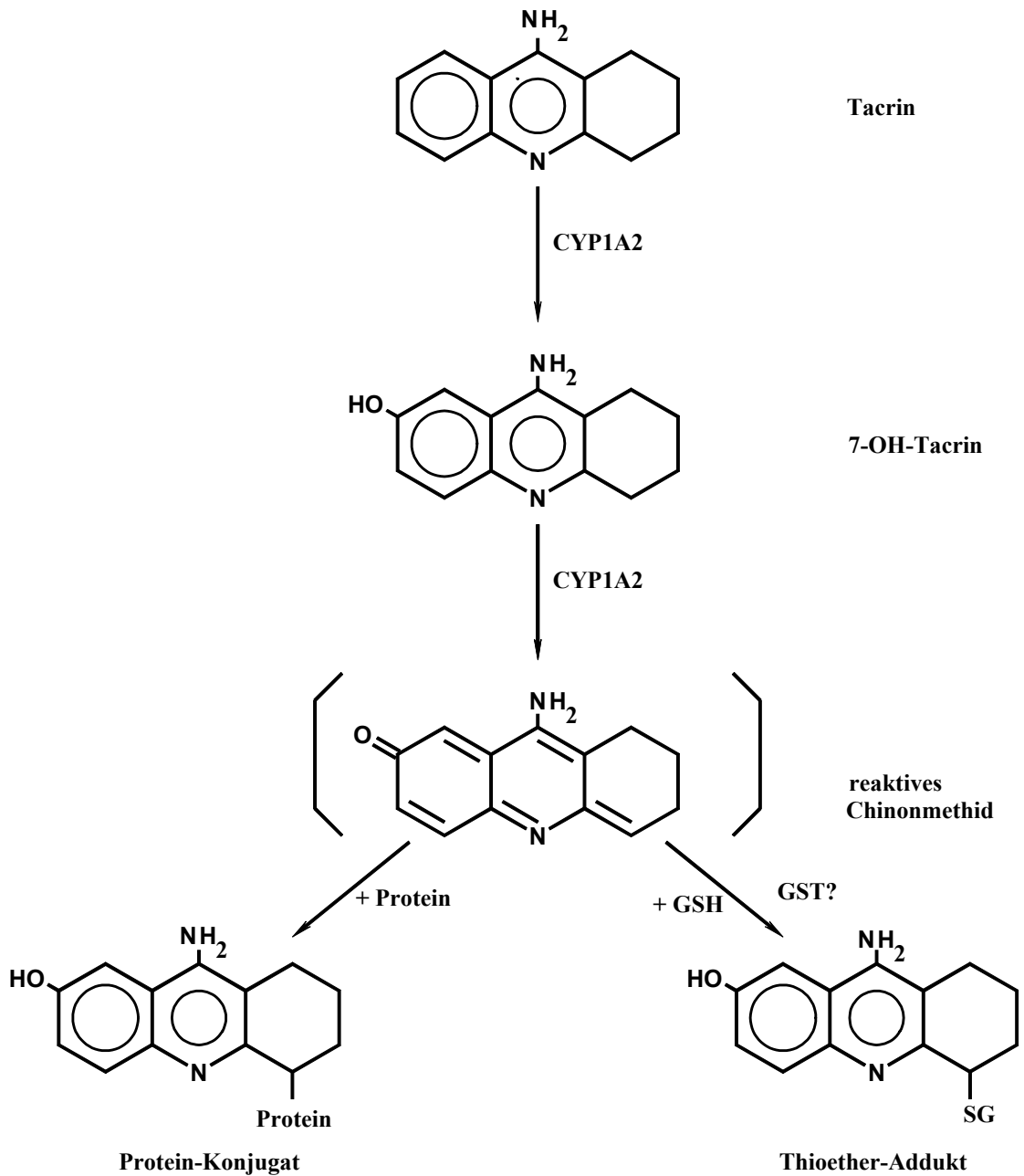


Abb. 18: Doppelt reziproke Darstellung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration in Gegenwart verschiedener Tacrin-Konzentrationen ($5 \leq n \leq 8$ je Konzentration)

Die bisherigen Untersuchungen stützen die Hypothese, dass Tacrin wahrscheinlich kein Substrat der GSTT1-1 ist. In weiterführenden Studien müßte der Einfluss der Metaboliten des Tacrin auf die GSTT1-1-vermittelte Umsetzung von Dichlormethan in analoger Weise untersucht werden. Bisher sind die Metaboliten 1-OH-, 2-OH-, 3-OH-, 4-OH- und 7-OH-Tacrin beim Menschen identifiziert worden (Madden *et al.*, 1995, Pool *et al.*, 1997). Im Zeitraum der hier dargestellten Untersuchungen waren Tacrin-Metaboliten nicht kommerziell erhältlich.

Falls Tacrin-Metaboliten von GSTT1-1 verstoffwechselt werden können, wäre dies eine mögliche Erklärung für die stärkere hepatotoxische Wirkung von Tacrin auf Alzheimer-Patienten mit dem *GSTT1*0/0*-Genotyp (Bequemont *et al.*, 1997). Diese Patienten wären nicht in der Lage, die durch das Cytochrom P450-System entstandenen reaktiven Metaboliten zu entgiften. Madden *et al.* (1995) zeigten *in vitro* mit Humanlebermikrosomen, dass die Bildung protein-reaktiver

Chinonmethid-Metaboliten von Tacrin und 7-OH-Tacrin in Gegenwart von 500 μM GSH signifikant verringert war. Aus Schema 10 wird deutlich, dass die Bildung des Thioether-Addukts auch durch Glutathion-S-Transferasen katalysiert werden könnte. Ob dabei eine Beteiligung von GSTT1-1 in Frage kommt, bleibt in weiteren Untersuchungen, wie oben beschrieben, zu klären.



Schema 10: Möglicher Mechanismus für die Bioaktivierung von Tacrin durch CYP1A2 und die Entgiftung reaktiver Metaboliten durch GST (modifiziert nach Madden *et al.*, 1995).

3.2 Arylamin-*N*-Acetyltransferase 1

3.2.1 Genotypisierung der Probanden

Allgemeines

Bei der Genotypisierung der 314 Probanden wurde auf das Vorhandensein der Allele *NAT1**3, *NAT1**4, *NAT1**10, *NAT1**11, *NAT1**14, *NAT1**15, *NAT1**17 und *NAT1**22 geprüft.

DNA-Extraktion

Die Extraktion der genomischen DNA wurde wie im Kapitel 3.1.1 beschrieben durchgeführt.

RFLP-PCR

Die bisher bekannten *NAT1*-Allele sind überwiegend durch das Auftreten von Punktmutationen charakterisiert. Diese dienen als Erkennungsstelle für Restriktionsendonukleasen und werden daher als Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (*restrictions fragment length polymorphisms*, RFLPs) bezeichnet. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakterieller Herkunft mit der Eigenschaft, DNA-Abschnitte sequenzspezifisch hydrolysieren zu können.

Mit den in Kapitel 4.4.2 angegebenen Primern wurden zunächst *NAT1*-spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert. Außer bei der Mutation T¹⁰⁸⁸A, deren Identifizierung mittels allelspezifischer PCR erfolgte, wurden mit Hilfe der in Kapitel 4.4.2 aufgeführten Restriktionsenzyme diese DNA-Abschnitte hydrolysiert, so dass mutationsspezifische Fragmente entstanden. Beispielsweise führte die Inkubation eines 435 bp-DNA-Abschnittes mit dem Restriktionsenzym *BbsI* bei Vorliegen der Mutation A¹⁰⁹⁵C zu zwei Fragmenten mit 39 bp und 396 bp, während im Falle des Wildtyp-Allels der DNA-Abschnitt erhalten blieb.

Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Amplifikate und -Fragmente wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Die genaue

Zusammensetzung der Ansätze sowie die Reaktionsbedingungen sind Kapitel 4.4.2 zu entnehmen.

Genotypisierung der Probanden: Ergebnisse und Diskussion

Identifizierung der Allele. In dem untersuchten Probandenkollektiv wurde auf das Vorhandensein der *NAT1*-Allele *NAT1*3*, *NAT1*4*, *NAT1*10*, *NAT1*11*, *NAT1*14*, *NAT1*15*, *NAT1*17* und *NAT1*22* getestet. Die Allele *NAT1*17* und *NAT1*22* traten nicht auf. Tab. 24 zeigt im Überblick die nach derzeitigem Erkenntnisstand in den identifizierten Allelen enthaltenen Mutationen (siehe auch Tab. 10 und Schema 7). Die Häufigkeiten der identifizierten Allele und entsprechenden Genotypen der Individuen sind in Tab. 25 und Tab. 26 dargestellt.

Tab. 24: Mutationen der mittels Genotypisierung in der Population von 314 Probanden identifizierten *NAT1*-Allele.

<i>NAT1</i>-Allel	Nukleotide								
	-344	-40	445	459	559	560	640	1088	1095
<i>NAT1*4</i>	C	A	G	G	C	G	T	T	C
<i>NAT1*3</i>	C	A	G	G	C	G	T	T	A
<i>NAT1*10</i>	C	A	G	G	C	G	T	A	A
<i>NAT1*11</i>	T	T	A	A	C	G	G	9 bp-Del. 1077-85	A
<i>NAT1*14A</i>	C	A	G	G	C	A	T	A	A
<i>NAT1*15</i>	C	A	G	G	T	G	T	T	C

Tab. 25: Häufigkeiten der *NAT1*-Allele in einer unselektierten Population von 314 gesunden deutschen Probanden.

<i>NAT1</i>-Allel	n	Häufigkeit (%)	95% Vertrauensbereich
<i>NAT1*3</i>	19	3,03	1,47 – 5,25
<i>NAT1*4</i>	445	70,86	65,73 – 75,45
<i>NAT1*10</i>	126	20,06	15,95 – 24,52
<i>NAT1*11</i>	21	3,34	1,69 – 5,65
<i>NAT1*14A</i>	14	2,23	0,93 – 4,22
<i>NAT1*15</i>	3	0,48	0,02 – 1,71

Tab. 26: Häufigkeiten der *NAT1*-Genotypen in einer unselektierten Population von 314 gesunden deutschen Probanden.

<i>NAT1</i>-Genotyp	n	Häufigkeit (%)	95% Vertrauensbereich
<i>NAT1</i> *3/*3	3	0,95	0,02 - 3,65
<i>NAT1</i> *4/*3	10	3,19	0,92 - 7,01
<i>NAT1</i> *10/*3	3	0,95	0,02 - 3,65
<i>NAT1</i> *4/*4	163	51,91	43,39 - 59,90
<i>NAT1</i> *4/*10	87	27,70	20,54 - 35,34
<i>NAT1</i> *10/*10	13	4,14	1,48 - 8,31
<i>NAT1</i> *4/*11	12	3,82	1,29 - 7,88
<i>NAT1</i> *10/*11	5	1,59	0,19 - 4,68
<i>NAT1</i> *11/*11	2	0,64	0 - 3,10
<i>NAT1</i> *4/*14A	9	2,87	0,75 - 6,56
<i>NAT1</i> *10/*14A	5	1,59	0,19 - 4,68
<i>NAT1</i> *4/*15	1	0,32	0 - 2,49
<i>NAT1</i> *15/*15	1	0,32	0 - 2,49

Mit Hilfe der mathematischen Gleichung der Hardy-Weinberg-Regel wurde analog zu Kapitel 3.1.3 aus der durch Genotypisierung ermittelten Häufigkeit jedes *NAT1*-Allels (p) und der Summe aller übrigen Allele (q) der Erwartungswert $2pq$ für die heterozygoten Träger des jeweiligen Allels berechnet (siehe Tab. 27). Mit statistischen Testverfahren (χ^2 -Test, zweiseitiger exakter Fisher-Test) wurde überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den durch Genotypisierung ermittelten Häufigkeiten der heterozygoten Träger des jeweiligen Allels und dem mit Hilfe der Hardy-Weinberg-Regel berechneten Erwartungswert bestehen. Für das *NAT1**15-Allel wurde ein solcher statistisch signifikanter Unterschied gefunden ($p < 0,01$), für alle übrigen Allele bestand eine Übereinstimmung beider Werte. Damit ist anzunehmen, dass sich die untersuchte Population annähernd im genetischen Gleichgewichtszustand befindet.

Tab. 27: Vergleich der Häufigkeiten der heterozygoten Träger von *NAT1*-Allelen mit dem Erwartungswert, berechnet mit der mathematischen Gleichung der Hardy-Weinberg-Regel.

<i>NAT1</i> -Allel	Allelhäufigkeit nach Genotypisierung (p)	Summe aller übrigen Allele der Population (q)	Häufigkeit der heterozygoten Träger des Allels nach Genotypisierung (aus Tab. 26)	Erwartungswert der heterozygoten Träger des Allels nach Hardy-Weinberg ($2 \cdot p \cdot q$)
<i>NAT1</i> *3	0,0303	0,9697	0,0414	0,0588
<i>NAT1</i> *4	0,7086	0,2914	0,3950	0,4130
<i>NAT1</i> *10	0,2006	0,7994	0,3183	0,3207
<i>NAT1</i> *11	0,0334	0,9666	0,0541	0,0646
<i>NAT1</i> *14A	0,0223	0,9777	0,0446	0,0436
<i>NAT1</i> *15	0,0048	0,9952	0,0032	0,0010

Ethnische Unterschiede. Aus der in Tab. 11 dargestellten interethnischen Verteilung der *NAT1*-Allele wurden die europäischen Bevölkerungsgruppen ausgewählt und den eigenen Ergebnissen gegenübergestellt (Tab. 28). Wegen des geringen Stichprobenumfangs war die englische Population von Payton and Sim (1998) nicht einbezogen.

Tab. 28: Häufigkeiten ausgewählter *NAT1*-Allele in europäischen Bevölkerungsgruppen.

Population (Zahl der Individuen)	<i>NAT1</i> -Allelhäufigkeit in der Population (%)										Literatur
	*3	*4	*10	*11	*14A	*14B	*15	*17	*22	*24	
Dänen (471)	n.b.	73,9	24,7	1,4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	Okkels <i>et al.</i> , 1997
Franzosen (322)	2,0	74,4	20,5	1,4	1,7	0	0	n.b.	n.b.	n.b.	Bouchardy <i>et al.</i> , 1998
Engländer (112)	2,7	77,7	16,1	4,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	Bell <i>et al.</i> , 1995a
Deutsche (314)	3,0	70,9	20,1	3,3	2,2	0	0,5	0	0	n.b.	eigene Daten ^a

^a Bruhn *et al.* (1999)

Mit dem χ^2 -Test und dem zweiseitigen exakten Fisher-Test wurde auf signifikante Unterschiede der Allelhäufigkeiten getestet. Zwischen den Häufigkeiten im Auftreten der Allele *NAT1**4, *3 und *10 bestand bei Dänen, Franzosen, Engländern und Deutschen kein signifikanter Unterschied. Das *NAT1**11 Allel trat bei den deutschen Individuen signifikant häufiger auf als bei Franzosen ($p = 0,026$)

und Dänen ($p = 0,012$). Zwischen deutschen und englischen Probanden war hinsichtlich der Häufigkeit dieses Allels kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Im internationalen Vergleich zeigten erste Studien größere Unterschiede in der Verteilung der *NAT1*-Allele bei europäischen und amerikanischen Populationen einerseits und asiatischen Bevölkerungsgruppen andererseits. Innerhalb Europas konnte unter Verwendung der eigenen Ergebnisse lediglich ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des *NAT1*11*-Alleles festgestellt werden; weitere Unterschiede sind jedoch nicht ausgeschlossen. Es wird damit erneut die Bedeutung der Kenntnis der ethnischen Herkunft der Probanden in epidemiologischen Studien unterstrichen.

3.2.2 Phänotypisierung der Probanden

Allgemeines

Von den 314 genotypisierten Probanden wurden für die Phänotypisierungs-Studie 105 Individuen so ausgewählt., dass einerseits die unter Europäern am häufigsten auftretenden Allele *NAT1*4* und *NAT1*10* in repräsentativem Umfang enthalten waren. Andererseits wurden möglichst viele Probanden mit den selteneren Allelen (*NAT1*3*, *NAT1*11*, *NAT1*14A* und *NAT1*15*) in die Studie einbezogen. Das Ziel der Untersuchungen bestand darin, mit einer zuverlässigen Methode im Hämolysat der Probanden die Geschwindigkeiten des Substratumsatzes zu bestimmen, miteinander zu vergleichen sowie für jedes Individuum die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} näherungsweise zu berechnen. Das von Grant *et al.* (1991) beschriebene Verfahren zur Bestimmung der *NAT1*-Aktivität wurde auf die konkreten Bedingungen der vorliegenden Studie angepasst. Dabei wurden im Rahmen der Methodenetablierung und -validierung eine Optimierung der Probenvorbereitung, der Enzymmenge, der Inkubationszeit und der Substrat- und Cosubstratkonzentration, die Prüfungen auf Stabilität und Wiederfindungsrate der Analyten, Präzision, Richtigkeit und Spezifität der verwendeten Methode, sowie verschiedene Untersuchungen zu den Kalibrierfunktionen durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte während der Phänotypisierungs-Studie eine

Qualitätssicherung durch Kontrolle der zeitabhängigen Präzision und Richtigkeit der Bestimmung der Analyten sowie der Stabilität des Enzyms unter Lagerungsbedingungen mit Hilfe eines selbst gewonnen Kontrollmaterials. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im folgenden dargestellt. Die genaue Zusammensetzung der Reaktionsansätze und verwendeten Lösungen ist in Kapitel 4.4.3 beschrieben.

Bestimmung von PABA und NAcPABA

Zur Bestimmung von PABA und NAcPABA wurde ein HPLC-Verfahren in Anlehnung an die von Lindsay *et al.* (1988) beschriebenen Bedingungen etabliert. Anstelle des dort verwendeten internen Standards *p*-Hydroxybenzoesäure, der sich bei vorliegenden Untersuchungen nicht ausreichend von den Analyten trennen ließ, wurde *p*-Acetamidophenol verwendet. Die gute Auftrennung der Peaks von internem Standard (RT: 4,35 min), PABA (RT: 5,45 min) und NAcPABA (RT: 6,97 min) ist aus Abb. 19 erkennbar. Die Quantifizierung erfolgte unter Bezug auf die Kalibrierfunktionen des jeweiligen Versuchstages mittels Quotientenbildung aus den Peakhöhen von PABA und internem Standard bzw. NAcPABA und internem Standard.

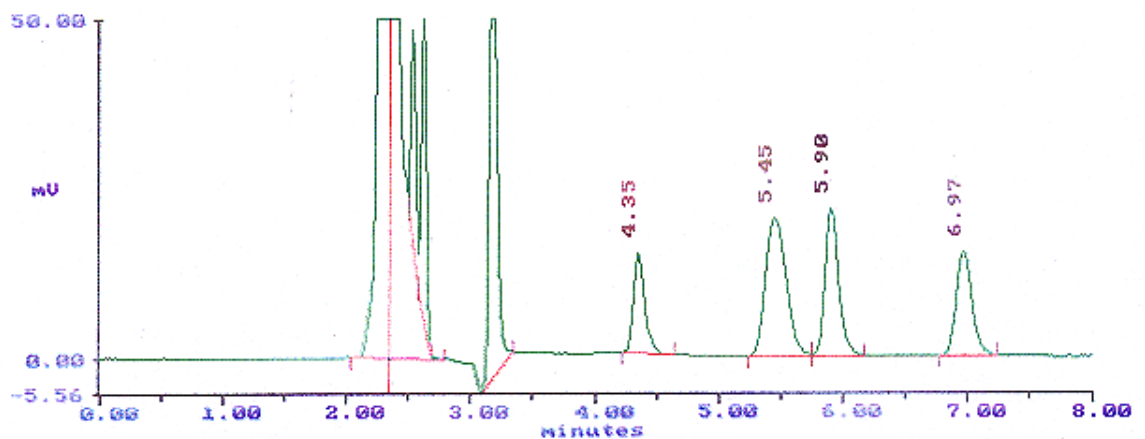


Abb. 19: HPLC-Analyse eines Gemisches aus internem Standard *p*-Acetamidophenol (RT: 4,35 min), PABA (RT: 5,45 min) und NAcPABA (RT: 6,97 min).

Inkubationsbedingungen

Die Inkubation der Blutproben erfolgte bei einer Temperatur von 37°C. Nach einer fünfminütigen Temperierung des Ansatzes erfolgte der Start der enzymatischen Reaktion durch Zugabe der Substratlösung. Nach 10 min wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 15%iger Perchlorsäure (V/V) gestoppt. Die Zusammensetzung des Inkubationsansatzes wurde in Anlehnung an Grant *et al.* (1991) an die Bedingungen der vorliegenden Studie angepasst.

Optimierung der Probenvorbereitung

Bei Untersuchungen von Lindsay *et al.* (1988) war der Umsatz von PABA in Gesamtblut signifikant höher als in gewaschenen roten Blutzellen. Dies ist begründet durch das Vorkommen von NAT1 sowohl in Erythrozyten als auch in Leukozyten, wobei die Aktivität in Erythrozyten ca. 99% der Gesamtkaktivität in Blutzellen beträgt (Risch *et al.*, 1996). In den für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten Gesamtblutproben war demnach die NAT1 aller Blutzellen enthalten. Zur Sicherung einer vollständigen Lysis der Erythrozyten wurden analog zu den Untersuchungen bei GSTT1-1 (siehe 0) verschiedene Verfahren der Probenvorbereitung geprüft. Aus Tab. 29 wird deutlich, dass drastischere Aufschlussmethoden tendenziell zu einer verringerten Enzymaktivität führen.

Tab. 29: Reaktionsgeschwindigkeit der Acetylierung von PABA bei verschiedenen Verfahren der Probenvorbereitung (1 ml-Ansatz, 50 µl Hämolysat, PABA: 100 µM, n = 2).

Verfahren der Probenvorbereitung	Reaktionsgeschwindigkeit (pmol NAcPABA/min·µl)
ein Einfrier- und Auftauzyklus	5,1 5,5
zwei Einfrier- und Auftauzyklen	3,8 4,5
vier Einfrier- und Auftauzyklen	3,9 4,2
ein Einfrier- und Auftauzyklus + 3 x 5 s Ultraschall (60 W/cm ²)	4,5 5,2
ein Einfrier- und Auftauzyklus + 6 x 5 s Ultraschall (60 W/cm ²)	4,9 4,1

Aus diesem Grund wurde einmaliges Auftauen der bei -80°C gelagerten Proben (ein Einfrier- und Auftauzyklus) als ausreichend für die vollständige Lysis der Erythrozyten betrachtet.

Optimierung der Enzymmenge

Es wurde die Abhängigkeit der Bildung des Produkts NAcPABA von der Enzymmenge (in μl Hämolsat) untersucht. In Abb. 20 ist eine lineare Abhängigkeit zwischen der Enzymmenge und der Reaktionsgeschwindigkeit bis $75\ \mu\text{l}$ Hämolsat erkennbar. Bei höheren Enzymmengen besteht offensichtlich ein Mangel an Substrat. Für die Phänotypisierung der Probanden wurden $25\ \mu\text{l}$ Hämolsat verwendet, da bei dieser Enzymmenge der Substratverbrauch bei den eingesetzten PABA-Konzentrationen unter 20% lag (siehe Tab. 30).

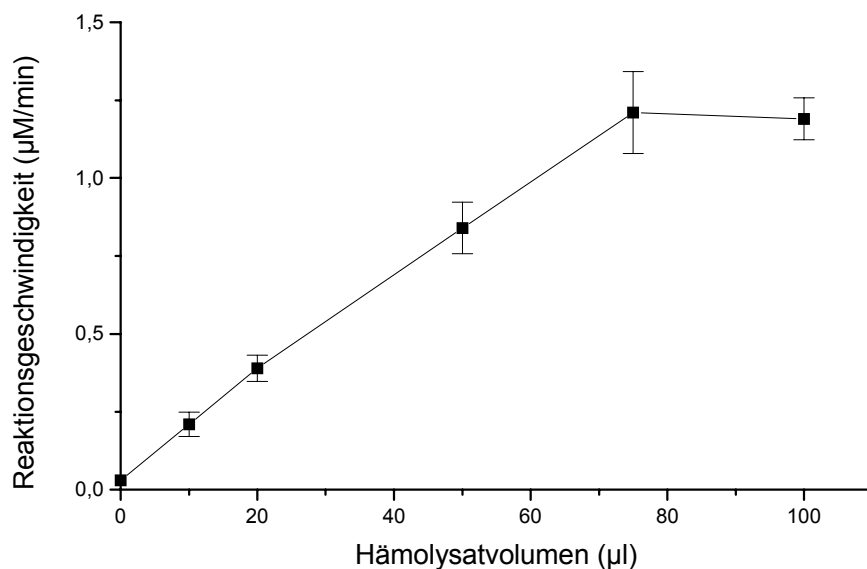


Abb. 20: Abhängigkeit der Acetylierungsgeschwindigkeit von PABA vom eingesetzten Hämolsatvolumen ($50\ \mu\text{M}$ PABA, Ansatzvolumen $1\ \text{ml}$, $n = 3$, $\bar{x} \pm R$).

Optimierung der Inkubationszeit

Die NAT1-katalysierte Acetylierung von PABA war über einen Zeitraum von 20 min annähernd linear (Abb. 21). Andere Autoren berichten über eine Instabilität von NAT1 bei Inkubationszeiten >10 min und 37°C (Grant *et al.*, 1991, Hein *et al.*, 1993). In einer Studie von Goodfellow *et al.* (2000) dagegen lag der Zeitraum, in dem 50% der ursprünglichen Aktivität eines in *E. coli* exprimierten humanen NAT1 4-Proteins *in vivo* erhalten blieb, bei $t_{1/2} = 4,7$ h (37°C). Für die Phänotypisierung der Probanden wurde eine Inkubationszeit von 10 min verwendet.

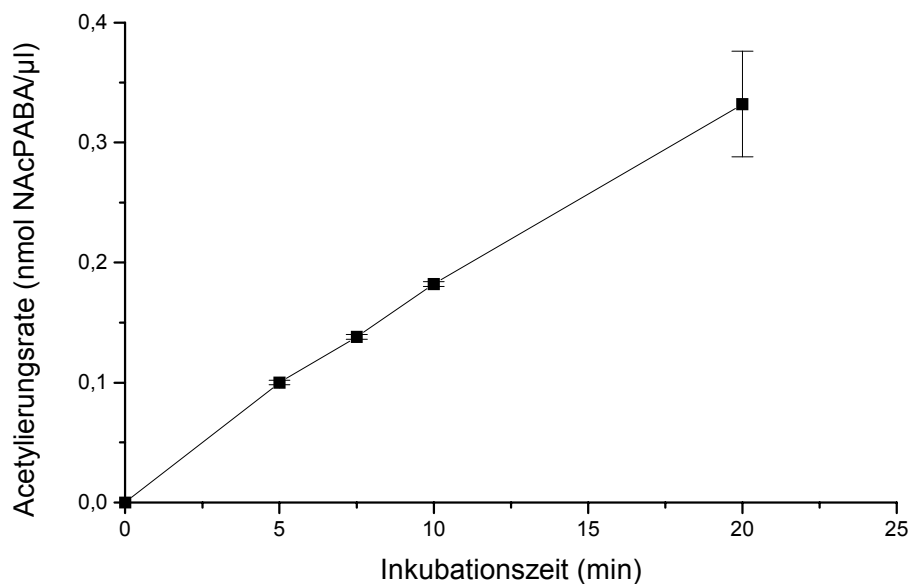


Abb. 21: Zeitabhängigkeit der Acetylierung von PABA (50 μ l Hämolyt, 100 μ M PABA, Ansatzvolumen 1 ml, $n = 4$, $\bar{x} \pm R$).

Optimierung der Substratkonzentration

Durch Voruntersuchungen mit dem Hämolyt einiger Probanden wurde zunächst der für die Messungen geeignete Substratkonzentrationsbereich eingegrenzt. Abb. 22 zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration im Bereich bis 100 μ M PABA. Die Daten lassen sich annähernd durch eine hyperbolische Funktion beschreiben, so dass angenommen werden kann, dass die enzymatische Umsetzung einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Für die Probandenserie wurden die Substratkonzentrationen 10, 20, 50 und 100 μ M PABA verwendet. Bei diesen Konzentrationen war PABA gut

wasserlöslich, so dass zur Vermeidung von Proteindenaturation auf den Zusatz von DMSO wie bei den Untersuchungen von Grant *et al.* (1991) verzichtet wurde.

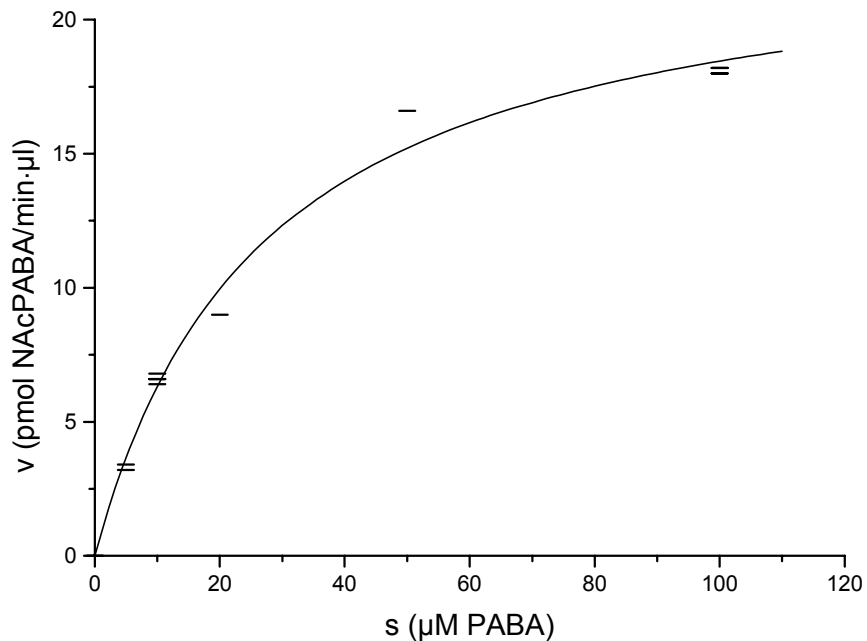


Abb. 22: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (v) von der Substratkonzentration (s) für die durch NAT1 katalysierte Acetylierung von PABA (50 µl Hämolysat in einem Ansatzvolumen von 1 ml, Inkubationszeit 10 min, $n = 4$).

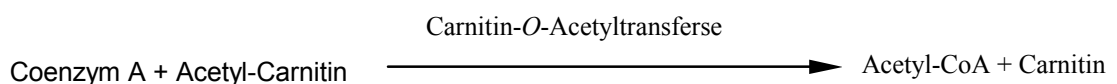
Mit der HPLC-Methode ist eine Ermittlung des Substratverbrauchs während der enzymatischen Reaktion möglich. Ein Hämolysatvolumen von 25 µl erwies sich im Rahmen der Methodenetablierung als geeignet zur Gewährleistung eines Substratverbrauchs unter 20% (siehe Tab. 30).

Tab. 30: Substratverbrauch bei den zur Phänotypisierung der Probanden verwendeten PABA-Konzentrationen bei 25 µl und 50 µl Hämolysat desselben Probanden (Ansatzvolumen 1 ml, Inkubationszeit 10 min, n = 2).

50 µl Hämolysat			25 µl Hämolysat	
eingesetzte Stoffmenge PABA (nmol) im Ansatz	Stoffmenge PABA (nmol) im Ansatz nach Inkubation	Substratverbrauch (%)	Stoffmenge PABA (nmol) im Ansatz nach Inkubation	Substratverbrauch (%)
10	6,1	39,0	8,0	20,0
	6,0	40,0	8,3	17,0
20	13,6	32,0	17,5	12,5
	13,6	32,0	17,4	13,0
50	39,7	20,6	45,9	8,2
	38,0	24,0	47,2	5,6
100	93,9	6,1	97,9	2,1
	95,6	4,4	95,3	4,7

Optimierung der Cosubstratkonzentration

Von großer Bedeutung ist die Konzentration des Cosubstrats Acetyl-Coenzym A. Sie sollte einerseits ausreichend hoch sein, um eine zeitlich konstante Reaktionsgeschwindigkeit der Acetylierung zu gewährleisten. Andererseits wurde eine Produkthemmung bei Anwesenheit hoher Coenzym-A-Konzentrationen beobachtet (Andres *et al.*, 1985). Die Lösung dieses Problems bietet die Verwendung eines Acetyl-CoA-regenerierenden Systems. Bei vorliegenden Untersuchungen wurden in Anlehnung an die Methode von Grant *et al.* (1991) 200 µl Acetyl-CoA (450 µM) sowie das gleiche Volumen dieses Systems, bestehend aus Acetylcarnitin und Carnitin-O-Acetyltransferase, in Triethanolamin-Puffer (siehe 4.4.4) verwendet. Durch die geringe Konzentration von 90 µM Acetyl-CoA im Ansatz wurde einerseits o.g. Produkthemmung erschwert, andererseits war durch die Reaktion



eine ständige Regenerierung des verbrauchten Acetyl-CoA gewährleistet.

Stabilität und Wiederfindungsrate von PABA und NAcPABA

Stabilität unter Lagerungsbedingungen. Zur Phänotypisierung der Probanden wurden zwecks Rationalisierung des Arbeitsablaufs wässrige Lösungen der verwendeten Substratkonzentrationen sowie der Kalibrierproben einmalig hergestellt, portioniert und bei -80°C vorrätig gehalten. Die Stabilität dieser Lösungen wurde überprüft, indem nach einer, sechs und acht Wochen Lagerung die Konzentrationen bestimmt und mit der Konzentration der Ausgangslösung verglichen wurden. Nach Shah *et al.* (1992) ist die Stabilität eines Analyten dann gewährleistet, wenn die Konzentration nach entsprechender Lagerungszeit 80 - 120% der Ausgangskonzentration beträgt. Wie Tab. 31 zeigt, ist diese Anforderung erfüllt.

Tab. 31: Konzentration von PABA und NAcPABA in % der Konzentration der Ausgangslösung nach Lagerung bei -80°C (n = 2).

		Gehalt in % des Ausgangswertes nach		
		1 Woche	6 Wochen	8 Wochen
PABA	20	104,6	101,6	114,5
		106,0	103,5	116,6
	50	101,6	100,5	106,9
		103,0	101,6	109,8
	100	97,9	97,1	107,5
		106,6	101,4	-
NAcPABA	5	108,2	94,8	112,1
		107,4	94,0	112,8
	10	104,9	98,0	109,9
		104,3	97,7	110,3
	20	103,5	100,4	107,9
		104,9	99,8	107,1

Stabilität unter Inkubationsbedingungen. Es wurde geprüft, ob während der Inkubationszeit (10 min) eine Zersetzung von NAcPABA auf nichtenzymatischen oder enzymatischem Wege stattfindet. Zur Prüfung auf nichtenzymatische Zersetzung wurde in Ansätzen mit dem Hämolytatzweier Probanden (genaue Zusammensetzung siehe Kapitel 4.4.4) zunächst mit Perchlorsäure das Enzym denaturiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von NAcPABA-Lösungen in den Konzentrationen, die der aus Vorversuchen bekannten Produktbildung dieser

Probanden entsprachen. Unter diesen Bedingungen konnte keine Bildung von PABA nachgewiesen werden. Zur Prüfung auf Bildung von PABA durch die Aktivität von Deacetylasen (enzymatische Zersetzung von NAcPABA) wurden mit dem Hämolysat eines Probanden Ansätze mit 2, 4 und 8 μM NAcPABA (Bereich der Produktbildung, in Vorversuchen ermittelt) sowie zusätzlich 10 und 20 μM NAcPABA hergestellt. Es war lediglich in den 20 μM -Ansätzen eine PABA-Bildung nachweisbar, die einer Zersetzung von ca. 5% der eingesetzten NAcPABA-Konzentration entspricht. Daher wurde angenommen, dass die Aktivität von Deacetylasen in dem hier relevanten Konzentrationsbereich keine Bedeutung hat.

Stabilität während der Analyse. Es wurde außerdem überprüft, ob die Lösungen der Analyten während der Verweildauer im automatischen Probengeber bei Raumtemperatur (25°C) stabil waren. Diese Verweildauer konnte je nach Bestückung bis zu 450 min betragen (Aufnahmevermögen 50 Proben, Analysendauer 8 min, siehe Abb. 19, Pause zwischen zwei Injektionen ca. 1 min). Es wurden wässrige PABA- bzw. NAcPABA-Lösungen verschiedener Konzentrationen nach der angegebenen Verweildauer im automatischen Probengeber analysiert und die prozentuale Abweichung der Konzentration vom Ausgangswert ermittelt (siehe Tab. 32). Auch nach längerer Verweildauer lag die prozentuale Abweichung vom Sollwert unter $\pm 5\%$, daher war die Stabilität während der Analyse gewährleistet.

Tab. 32: Stabilität der Analyten während der Verweildauer im automatischen Probengeber der HPLC-Anlage bei Raumtemperatur; wässrige PABA- und NAcPABA-Lösungen der angegebenen Konzentrationen, n = 2.

Substanz	Sollwert (µM)	Gehalt in % der Ausgangskonzentration (Sollwert) nach Verweildauer von		
		120 min	240 min	480 min
PABA	10	105,0 103,0	101,0 102,0	n.b.
	100	99,9 97,2	n.b.	101,0 100,8
NAcPABA	5	96,0 96,0	99,2 97,6	n.b.
	20	100,0 100,0	n.b.	102,8 102,8

Wiederfindungsrate. Die Ergebnisse der Bestimmung der Wiederfindungsrate bei ausgewählten Konzentrationen PABA und NAcPABA des Kalibrierbereichs sind in Tab. 33 dargestellt. Die relative Standardabweichung liegt unter 15%, damit ist die Präzision der Bestimmung der WFR als ausreichend zu bewerten.

Tab. 33: Wiederfindungsrate von PABA und NAcPABA in der Probenmatrix. Herstellung der Ansätze wie unter Kalibrierung (Kapitel 4.4.4) angegeben. Die WFR ist der Mittelwert aus n = 6.

	PABA		NAcPABA		
Konzentration (µM)	25	50	5	10	20
WFR (%)	93,4	96,0	99,6	106,4	105,1
s _{rel} (%)	4,9	8,0	8,1	9,7	11,7

Präzisionskontrollen

Messpräzision. Die Messpräzision der HPLC-Anlage wird bei Verwendung eines automatischen Probengebers wesentlich von der Präzision des Einspritzvorganges bestimmt. Bei zehnmalem Vermessen einer PABA-Lösung (50 µM) lag die relative Standardabweichung der Peakhöhen des Analyten bei 0,97% und damit unter der für die Messpräzision empfohlenen Grenze von 1% (Kromidas *et al.*, 1995).

Methodenpräzision. Die serielle Präzision der HPLC-Bestimmung von PABA und NAcPABA wurde an drei Tagen mit verdünnten Lösungen der Analyten in drei verschiedenen Konzentrationen ($n = 6$ je Konzentration und Tag) ermittelt. Der Sollwert als bestmögliche Näherung an den wahren (richtigen) Wert wurde durch drei unabhängige Einwägen der beiden Substanzen sichergestellt. Tab. 34 und Tab. 35 zeigen, dass in keiner der untersuchten Serien das Akzeptanzkriterium für die Präzision ($s_{\text{rel}} = 15\%$, Shah *et al.*, 1992) überschritten wird.

Kontrolle der Richtigkeit der Bestimmung von PABA und NAcPABA

Als Akzeptanzkriterium für die Richtigkeit gilt, dass die mittlere relative Abweichung der Analysenergebnisse einer Mehrfachbestimmung ($n \geq 5$) vom Sollwert maximal $\pm 15\%$ betragen darf (Shah *et al.*, 1992). Tab. 34 und Tab. 35 zeigen, dass dieses Kriterium bei allen Bestimmungen für beide Substanzen erfüllt wurde.

Tab. 34: Kontrolle der seriellen Präzision und der Richtigkeit der HPLC-Bestimmung von PABA ($n = 6$ je Konzentration und Tag).

Sollwert (μM PABA)	Tag	\bar{x} der Bestimmungen (μM PABA)	s	Serielle Präzision (s_{rel} in %)	Mittlere relative Abweichung vom Sollwert (%)
10,0	1	10,0	0,2	2,0	0,4
	2	9,8	0,04	0,4	-1,6
	3	9,5	0,3	3,2	-4,7
50,0	1	49,9	0,3	0,6	-0,2
	2	50,1	0,2	0,4	0,2
	3	50,3	0,4	0,8	0,7
100,0	1	101,6	0,7	0,7	1,6
	2	101,8	1,2	1,2	1,8
	3	100,1	0,8	0,8	0,1

Tab. 35: Kontrolle der seriellen Präzision und der Richtigkeit der HPLC-Bestimmung von NAcPABA (n = 6 je Konzentration und Tag).

Sollwert (μM NAcPABA)	Tag	\bar{x} der Bestimmungen (μM NAcPABA)	s	Serielle Präzision (s_{rel} in %)	Mittlere relative Abweichung vom Sollwert (%)
5,0	1	4,9	0,03	0,6	-2,0
	2	4,9	0,04	0,8	-3,0
	3	4,9	0,04	0,8	-2,2
10,0	1	10,0	0,1	1,0	0,3
	2	9,4	0,1	1,1	-5,7
	3	10,0	0,1	1,0	0,2
50,0	1	50,9	0,2	0,4	1,8
	2	51,3	0,2	0,4	2,6
	3	50,0	0,6	1,2	0,02

Spezifität der Bestimmung von PABA und NAcPABA

Wie bei der Phänotypisierung der Probanden hinsichtlich GSTT1-1 wurde von jedem Probanden der Leerwert in zwei substratfreien Ansätzen nach 10 min Inkubation bestimmt und das Mittel von den Messwerten der regulären Inkubationsansätze subtrahiert.

Bei der HPLC-Analyse der Proben trat zwischen dem PABA- und dem NAcPABA-Peak ein dritter Peak bei einer Retentionszeit von 5,9 min auf (siehe Abb. 19). Sein Erscheinen ist vom Substrat unabhängig, da er auch in den substratfreien Ansätzen detektiert werden konnte. Da er sich stets klar von den übrigen relevanten Peaks abtrennen ließ, stellte er keine Interferenz dar.

Untersuchungen zur Kalibrierfunktion

Erstellung der Kalibrierfunktion. Nach Vorversuchen wurde zur Bestimmung der Kalibrierfunktion für PABA der Bereich 10-100 μM und für NAcPABA der Bereich 5 - 50 μM ausgewählt, da in diesem Bereich die meisten Signale der Probandenproben zu erwarten waren. Es wurden für die PABA-Konzentrationen 10, 20, 25, 50 und 100 μM sowie für die NAcPABA-Konzentrationen 5, 7,5, 10, 20 und 50 jeweils 6 Bestimmungen durchgeführt. Damit war die Empfehlung, wonach das

Produkt aus der Anzahl der Kalibrierproben und der Wiederholbestimmungen pro Kalibrierprobe $n = 24$ betragen sollte, berücksichtigt (McDowall *et al.*, 1995). Die Herstellung der Ansätze ist in Kapitel 4.4.4 beschrieben. Abb. 23 und Abb. 25 zeigen die grafischen Darstellungen der Kalibrierfunktionen für PABA und NAcPABA.

Linearität. Zur Beurteilung der Linearität der Abhängigkeit des Analysensignals von der Konzentration wurden die grafischen Darstellungen, die relativen Abweichungen der Konzentrationen vom richtigen Wert (Sollwert) sowie die Korrelationskoeffizienten herangezogen. Zusätzlich wurde auf Normalverteilung der Einzelwerte der Kalibrierkonzentrationen geprüft. Die grafischen Darstellungen lassen den Schluss zu, dass jeweils eine lineare Abhängigkeit des Analysensignals von der Konzentration des Analyten besteht. Die Akzeptanzgrenze für die relative Abweichung der Konzentrationen der Kalibrierproben vom richtigen Wert liegt bei 15%. Falls diese Bedingung nicht erfüllt werden kann, müssen jedoch mindestens vier von sechs Kalibrierproben je Konzentration innerhalb der Akzeptanzgrenze liegen (Shah *et al.*, 1992). Diese Anforderung ist für die Kalibrierproben von PABA und NAcPABA erfüllt (siehe Abb. 24 und Abb. 26). Die Korrelationskoeffizienten für die Kalibrierfunktion von PABA ($r = 0,995$) und für die von NAcPABA ($r = 0,976$) werden als ausreichend betrachtet. Mit dem Test nach Kolmogoroff-Smirnoff (siehe Kapitel 4.5) wurde festgestellt, dass sowohl bei PABA als auch bei NAcPABA die Einzelwerte der Kalibrierkonzentrationen nicht signifikant von der Normalverteilung abweichen. Da anhand der vorgenommenen Untersuchungen von einer Linearität der Kalibrierfunktionen ausgegangen werden konnte, wurden die Geradengleichungen jeweils durch ungewichtete lineare Regression bestimmt.

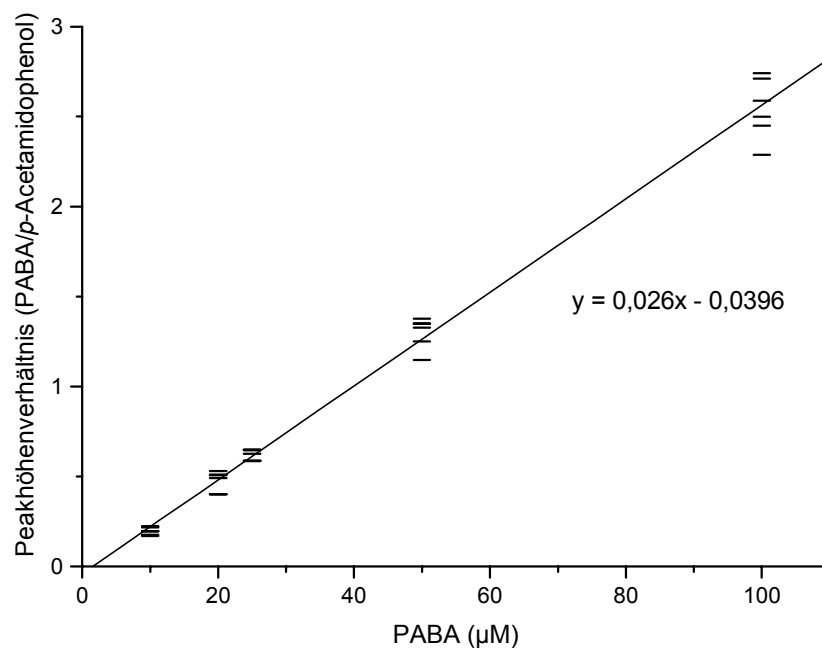


Abb. 23: Kalibrierfunktion für die HPLC-Bestimmung von PABA unter Verwendung des internen Standards *p*-Acetamidophenol (n = 6 je Konzentration).

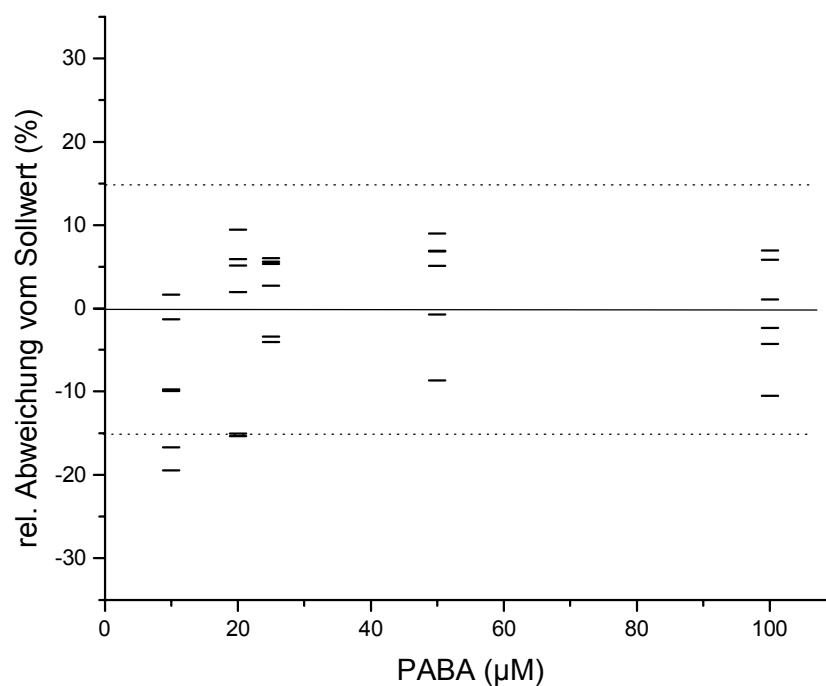


Abb. 24: Relative Abweichung der aus der Gleichung der Kalibrierfunktion berechneten Konzentrationen der PABA-Kalibrierproben vom Sollwert (..... Akzeptanzgrenze für die Richtigkeit).

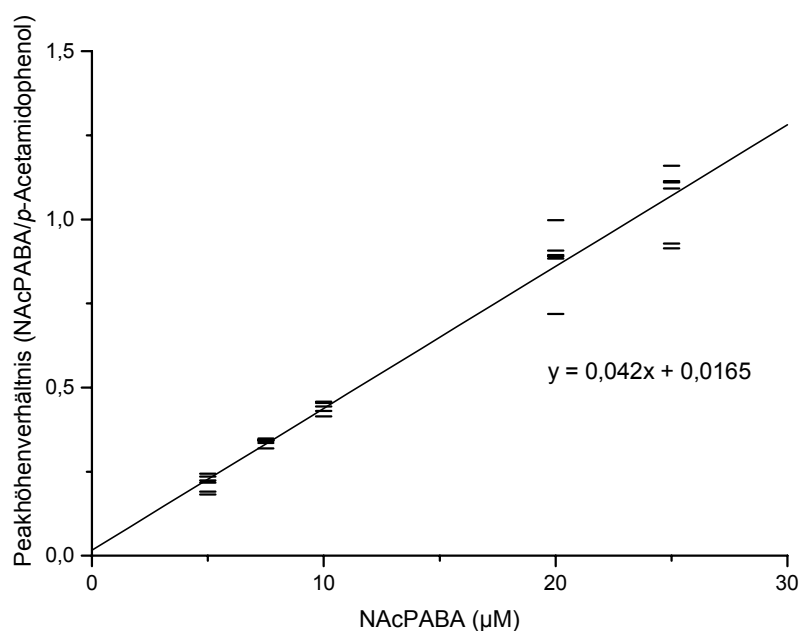


Abb. 25: Kalibrierfunktion für die HPLC-Bestimmung von NAcPABA unter Verwendung des internen Standards p-Acetamidophenol (n = 6 je Konzentration).

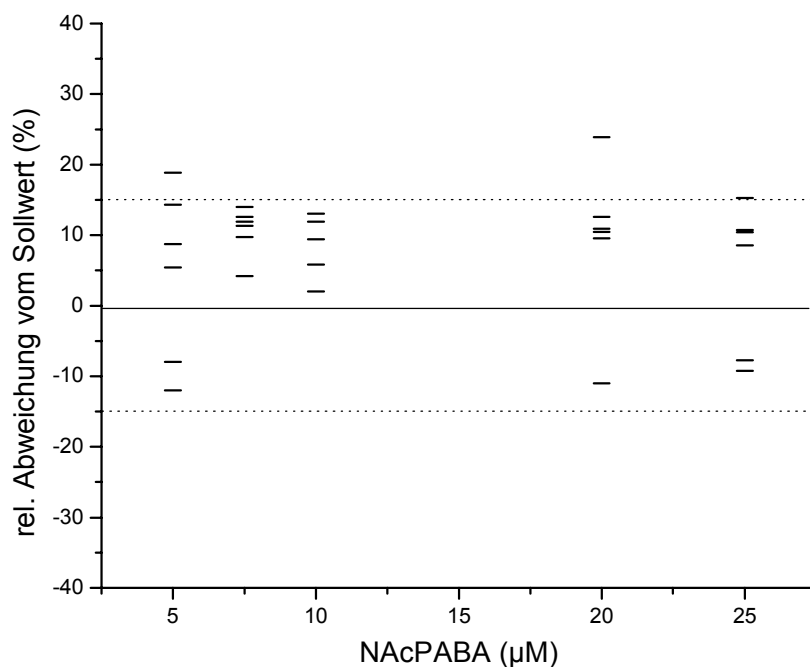


Abb. 26: Relative Abweichung der aus der Gleichung der Kalibrierfunktion berechneten Konzentrationen der NAcPABA-Kalibrierproben vom Sollwert (..... Akzeptanzgrenze für die Richtigkeit).

Bestimmungs- und Nachweisgrenze. Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden aus Hämolysat, das der üblichen Probenvorbereitung unterworfen worden war, Proben mit PABA-Konzentrationen von 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 und 10 μM und NAcPABA-Konzentrationen von 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4 und 7,5 μM ($n = 6$) hergestellt. Die Bestimmungsgrenze als diejenige Konzentration des Analyten, welche eine Signal mit einer Impräzision (s_{rel}) von maximal 20% und einer relativen Abweichung vom Sollwert zwischen 80 und 120% liefert, liegt für PABA bei einer Konzentration von 10 μM (s_{rel} : 12,2%, mittlere relative Abweichung vom Sollwert: -2,8%), das entspricht 40 pmol /min· μl Hämolysat. Diese Konzentration wurde auch bei der Phänotypisierung als kleinste Kalibrierkonzentration verwendet. Für NAcPABA waren erst ab 1 μM auswertbare Peaks zu erkennen. Bei dieser Konzentration lagen sowohl s_{rel} als auch die relative Abweichung vom Sollwert unter 20% (11,8% bzw. 19,6%). Die Bestimmungsgrenze für NAcPABA liegt demnach unter den gegebenen Bedingungen der Probenvorbereitung und Analytik bei 1 μM , das entspricht 4 pmol/min· μl Hämolysat. Als niedrigste Konzentration für die Kalibrierung wurden 5 μM gewählt.

Als Nachweisgrenzen von PABA und NAcPABA wurden die Konzentrationen definiert, die dem dreifachen Rauschsignal der Basislinie des Eluenten entsprachen (Buick *et al.*, 1990). Mit Hilfe der mitgeführten Kalibrierfunktionen wurde das Dreifache dieses Rauschens in die entsprechenden PABA- und NAcPABA-Konzentrationen umgerechnet. Dabei wurde für PABA eine Nachweisgrenze von 1,4 μM und für NAcPABA eine Nachweisgrenze von 0,6 μM ermittelt. Für PABA ergab erst eine Konzentration von 2 μM ein auswertbares Signal, die Nachweisgrenze lag daher bei 8 pmol/min· μl Hämolysat. Für NAcPABA waren unterhalb einer Konzentration von 1 μM keine auswertbaren Peaks vorhanden. Für diesen Analyten liegt daher die Nachweisgrenze wie die Bestimmungsgrenze bei 4 pmol/min· μl Hämolysat.

Qualitätssicherung während der Probenmessungen

Zeitabhängige Präzision. Zur Qualitätssicherung während der Probenmessungen wurden an jedem Messtag drei Qualitätskontrollproben mit NAcPABA-Konzentrationen von 5, 10 und 20 μM mitgeführt. Aus den Ergebnissen

der Messungen wurde die zeitabhängige Präzision der HPLC-Bestimmung von NAcPABA ermittelt. Tab. 36 zeigt, dass die Akzeptanzgrenze von $s_{\text{rel}} = 15\%$ nicht überschritten wurde. Damit ist die zeitabhängige Präzision der HPLC-Bestimmung von NAcPABA ausreichend.

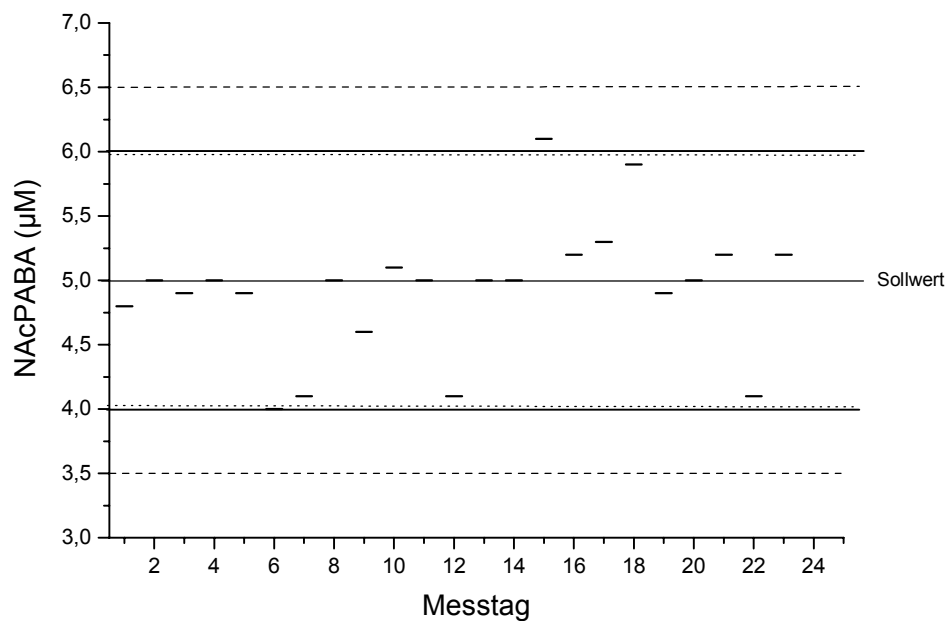
Tab. 36: Zeitabhängige Präzision der HPLC-Bestimmung von NAcPABA. Ansätze mit 25 μl Hämolyt, 375 μl Puffer, 200 μl Acetyl-CoA-regenerierendem System und 200 μl NAcPABA-Lösung zum Erreichen der angegebenen Endkonzentrationen.

	NAcPABA-Konzentration (μM)		
	5	10	20
\bar{x} (n = 23)	4,9	9,9	20,0
s	0,5	0,6	0,5
s_{rel} (%)	10,2	6,1	2,5

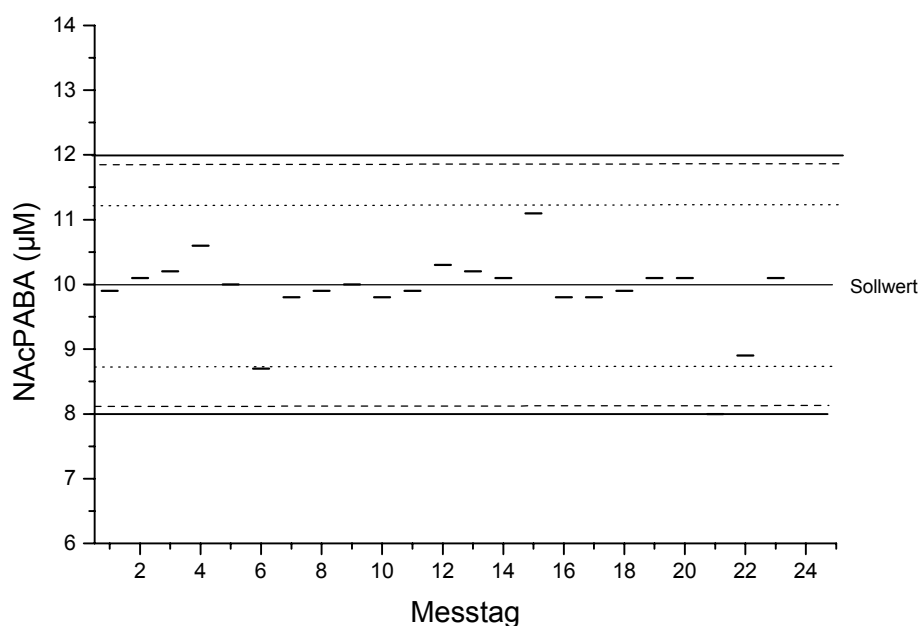
Durch das Mitführen von Enzymkontrollproben an jedem Messtag (n = 23, Doppelbestimmung) wurde überprüft, ob während der Lagerung der Proben Veränderungen der Enzymaktivität aufgetreten sind. Dazu wurde Hämolyt eines Probanden mit dem Genotyp *NAT1*4/*10*- (durch vorherige Genotypisierung und Phänotypisierung gesichert) in 100 μl -Portionen aufgeteilt und bei -80°C aufbewahrt. Die Inkubation erfolgte im 1 ml-Ansatz mit 25 μl Hämolyt und 100 μM PABA. Die relative Standardabweichung als Maß für die zeitabhängige Präzision der Messung der Enzymkontrollproben lag bei 13,4% ($\bar{x} \pm s = 18,6 \pm 2,5 \text{ pmol/min}\cdot\mu\text{l}$) und damit unter der Akzeptanzgrenze von 15%. Damit ist sichergestellt, dass im Messzeitraum keine problematischen Veränderungen der Enzymaktivität durch die Lagerung der Proben aufgetreten sind.

Qualitätsregelkarten. In Abb. 27a-c sind die Qualitätsregelkarten mit den während der Phänotypisierungs-Studie durchgeführten Messungen dargestellt. Die Akzeptanzgrenze für die Richtigkeit (Sollwert $\pm 20\%$) wurde an einem Tag bei der 5 μM -Konzentration überschritten. Da aber die beiden anderen Qualitätskontrollproben dieses Messtages die geforderte Richtigkeit aufwiesen, musste die Analysenserie nicht verworfen werden. Tab. 37 stellt dar, wieviele der Qualitätskontrollproben im jeweiligen Konzentrationsbereich innerhalb der

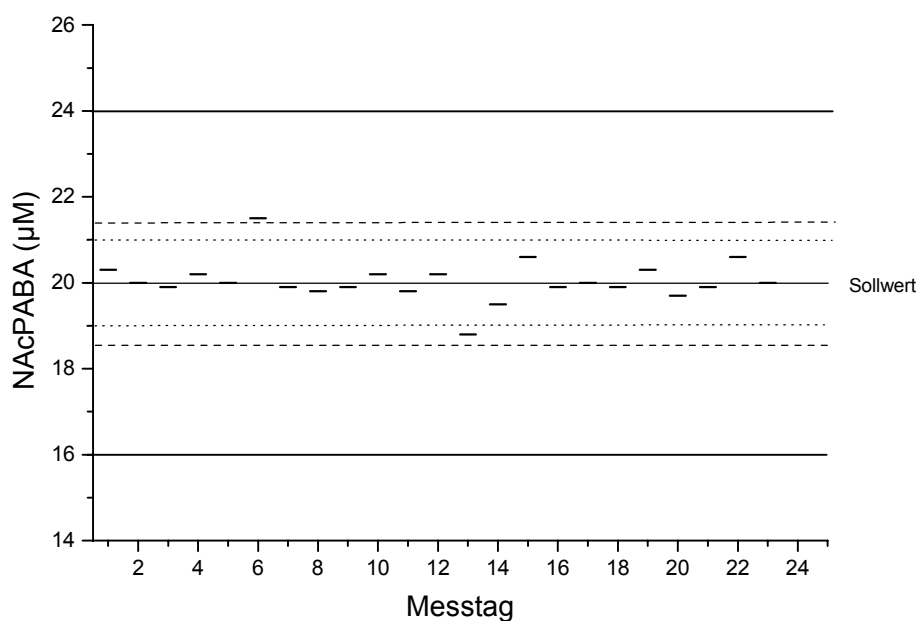
Grenzen von ± 5 , $\pm 10\%$ bzw. 20% des richtigen Wertes liegen. Ereignisse wie z. B. das Auftreten von sieben aufeinanderfolgenden Werten mit aufsteigender oder abfallender Tendenz können ebenfalls als Außer-Kontroll-Situation gewertet werden und zum Verwerfen einer Analysenserie führen. In vorliegender Serie trat jedoch keines dieser Ereignisse ein, so dass davon ausgegangen werden kann, dass während der gesamten Messungen keine unzulässig hohen systematischen Fehler bei Anwendung der HPLC-Methode aufgetreten sind. Die aus der Präzision der Methode berechneten Kontrollgrenzen (richtiger Wert \pm Dreifaches der Standardabweichung des Verfahrens) wurden nur an einem Messtag im oberen Konzentrationsbereich geringfügig überschritten (Abb. 27a). Die beiden anderen Qualitätskontrollproben dieser Serie lagen jedoch innerhalb der Grenzen, so dass die Ergebnisse dieses Messtages nicht verworfen werden mussten.



(a)



(b)



(c)

Abb. 27a-c: Qualitätsregelkarten zur Kontrolle von zeitabhängiger Präzision und Richtigkeit der Bestimmung von NAcPABA bei drei Konzentrationen: (a) 5 µM; (b) 10 µM; (c) 20 µM; (— Akzeptanzgrenze für die Richtigkeit: Sollwert ± 20%; Warngrenze: Sollwert ± zweifache Standardabweichung, berechnet aus den Einzelproben; ----- Kontrollgrenze: Sollwert ± dreifache Standardabweichung).

Tab. 37: Prozentuale Abweichung der Qualitätskontrollproben der HPLC-Bestimmung von NAcPABA vom Sollwert.

Konzentration (μM NAcPABA)	Anzahl der Qualitätsproben (n = 23)		
	Abweichung < $\pm 5\%$	Abweichung < $\pm 10\%$	Abweichung < $\pm 20\%$
5	15 (65,2%)	17 (73,9%)	22 (95,7%)
10	18 (78,3%)	19 (82,6%)	23 (100%)
20	21 (91,3%)	23 (100%)	-

Intraindividuelle versus interindividuelle Variabilität

In Untersuchungen von Ward *et al.* (1992) war die NAT1-Aktivität der Probanden (intraindividuelle Variabilität) über einen Zeitraum von zwei Jahren konstant. Zur Prüfung der intraindividuellen Variabilität in dieser Arbeit wurde innerhalb von vier Monaten die Reaktionsgeschwindigkeit im Hämolysat eines Probanden (Genotyp: *NAT1*4/*10*) jeweils mit 10, 20, 50 und 100 μM PABA bestimmt sowie V_{max} ermittelt. Die intraindividuelle Variabilität lag bei $s_{\text{rel}} = 11,9\%$ ($\bar{x} = 21,9$ pmol/min· μl , n = 7) für 100 μM PABA sowie $s_{\text{rel}} = 11,7\%$ ($\bar{x} = 28,2$ pmol/min· μl) für V_{max} . Damit wurde das Ergebnis o.g. Autoren bestätigt. Im Vergleich dazu lag die Variabilität der Reaktionsgeschwindigkeiten aller untersuchten Individuen mit dem Genotyp *NAT1*4/*10* bei 21,6% ($\bar{x} = 26,1$ pmol/min· μl). Es wird davon ausgegangen, dass die intraindividuelle Variabilität der NAT1-Aktivität der Probanden der vorliegenden Studie keinen maßgeblichen Einfluss auf die interindividuellen Schwankungen der Enzymaktivität aller Probanden desselben Genotyps hat.

Phänotypisierung der Probanden: Ergebnisse und Diskussion

Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit. An die Optimierung und Validierung schloss sich die Phänotypisierung der Probanden an, wobei Inkubationsansätze mit 25 μl Hämolysat, 375 μl 0,1 M Triethanolamin-Puffer (pH 7,5 mit 4,5 mM DTT und 4,5 mM EDTA), 200 μl des Acetyl-CoA-regenerierenden Systems (siehe Kapitel 4.4.4) und 200 μl Substratlösung mit 10, 20, 50 und 100 μM PABA (Endkonzentrationen im Ansatz) verwendet wurden. Für jeden Probanden wurde pro Substratkonzentration eine Doppelbestimmung sowie die

Bestimmung zweier substratfreier Leeransätze („Leerwerte“) durchgeführt. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in pmol NAcPABA pro min pro μ l Hämolysat sowie in pmol NAcPABA pro min pro mg Hämoglobin ermittelt. Die interindividuellen Schwankungen im Hämoglobingehalt der Blutproben waren gering; s_{rel} des Hb-Gehaltes der 104 NAT1-aktiven Probanden lag bei 7,4%. Zusätzlich wurden in den Reaktionsansätzen die PABA-Konzentrationen bestimmt. Dies diente der Kontrolle des Substratverbrauchs, der möglichst unter 20% liegen sollte (Richterich und Colombo, 1978).

Abb. 28 zeigt die Verteilung der Reaktionsgeschwindigkeiten aller Individuen bei einer Substratkonzentration von 100 μ M PABA. Es ist eine bimodale Verteilung der Reaktionsgeschwindigkeiten zu erkennen. Bei einer Antimode von 90 pmol/min·mg Hb zeigten 16% der Probanden eine geringe Umsetzungsgeschwindigkeit von PABA. In einer vergleichenden Genotyp-Phänotyp-Studie von Butcher *et al.* (1998) mit Reaktionsgeschwindigkeiten zwischen 5 und 20 nmol NAcPABA/min·mg Protein bei einer Substratkonzentration von 440 μ M PABA war bei etwa 8% aller Probanden ($n = 85$) die Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu den übrigen Individuen signifikant geringer. Diese Probanden waren heterozygote Träger entweder des *NAT1*14*- oder des *NAT1*17*-Allels. Eine derartige klare Trennung konnte bei den hier untersuchten Individuen nicht vorgenommen werden. Die Beziehungen zwischen Genotyp und Phänotyp der Probanden in vorliegender Studie werden im folgenden Kapitel 3.2.3 diskutiert.

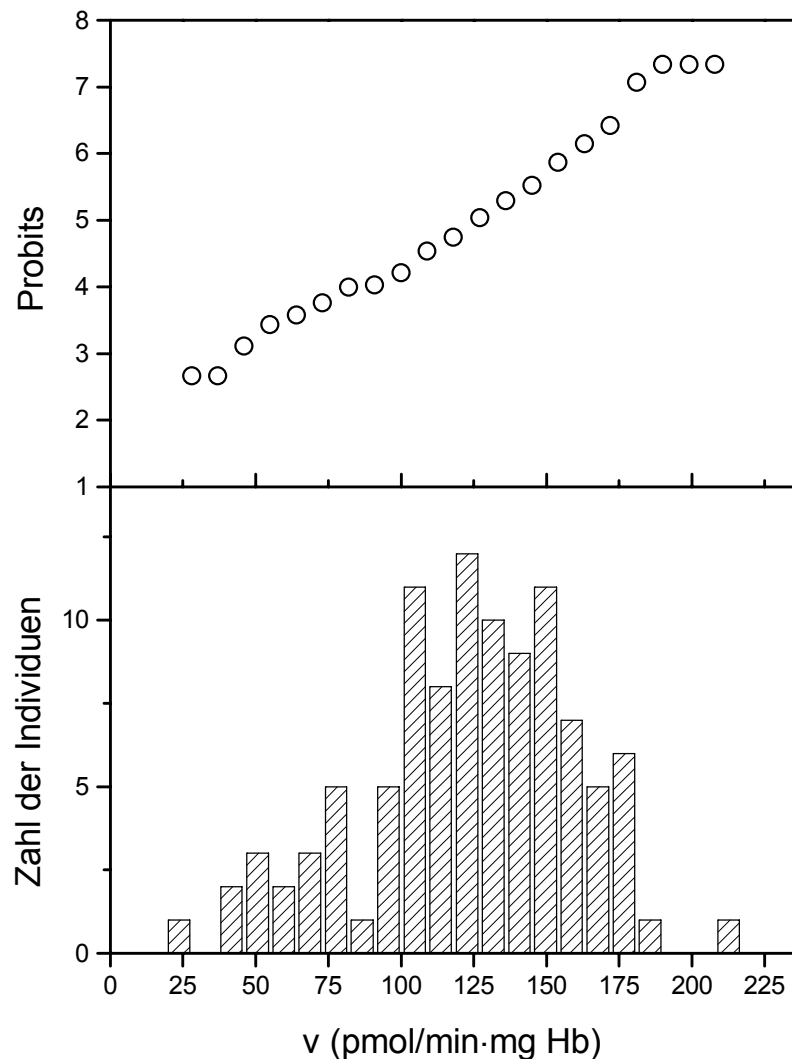


Abb. 28: Häufigkeitsverteilung der NAT1-katalysierten Reaktionsgeschwindigkeit bei der *N*-Acetylierung von PABA (Substratkonzentration 100 μ M, $n = 104$).

Bestimmung der enzymkinetischen Parameter. Für jeden Probanden wurden V_{\max} und K_m der NAT1-katalysierten Acetylierung von PABA näherungsweise ermittelt. Nach grafischer Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von den jeweiligen Substratkonzentrationen wurde unter Verwendung des Computerprogrammes Origin[®] (siehe Kapitel 4.5) nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate (Levenberg-Marquard-Algorithmus) eine hyperbolische Funktion mit der allgemeinen Gleichung $y = P_1 \cdot x / (P_2 + x)$ an

die Einzelwerte angepasst. Wegen $y = v$, $x = s$, $P_1 = V_{\max}$, $P_2 = K_m$ erfolgte die Ermittlung der enzymkinetischen Parameter aus der Funktionsgleichung. Abb. 29 zeigt beispielhaft die Abhängigkeit der PABA-Acetylierungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration im Hämolsat eines Probanden.

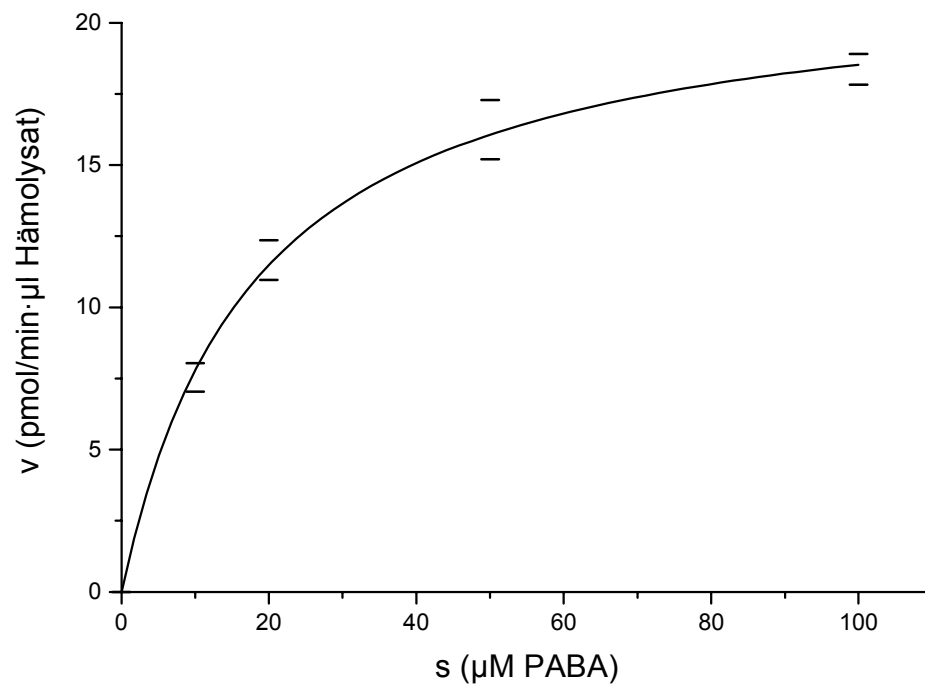


Abb. 29: Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit bei der *N*-Acetylierung von PABA in Abhängigkeit von der Substratkonzentration im Hämolsat eines Probanden.

3.2.3 Vergleich und Diskussion der Ergebnisse der Geno- und Phänotypisierung der Probanden hinsichtlich der Arylamin-*N*-Acetyltransferase 1

In Tab. 38 sind die Mediane und Spannweiten der V_{\max} - und K_m -Werte in Bezug zu den Genotypen der Individuen dargestellt. Bezüglich der K_m -Werte konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen gefunden werden. Angaben zu K_m -Werten finden sich in bisherigen Studien zur funktionellen Relevanz der *NAT1*-Allele relativ selten. In Untersuchungen von Butcher *et al.*

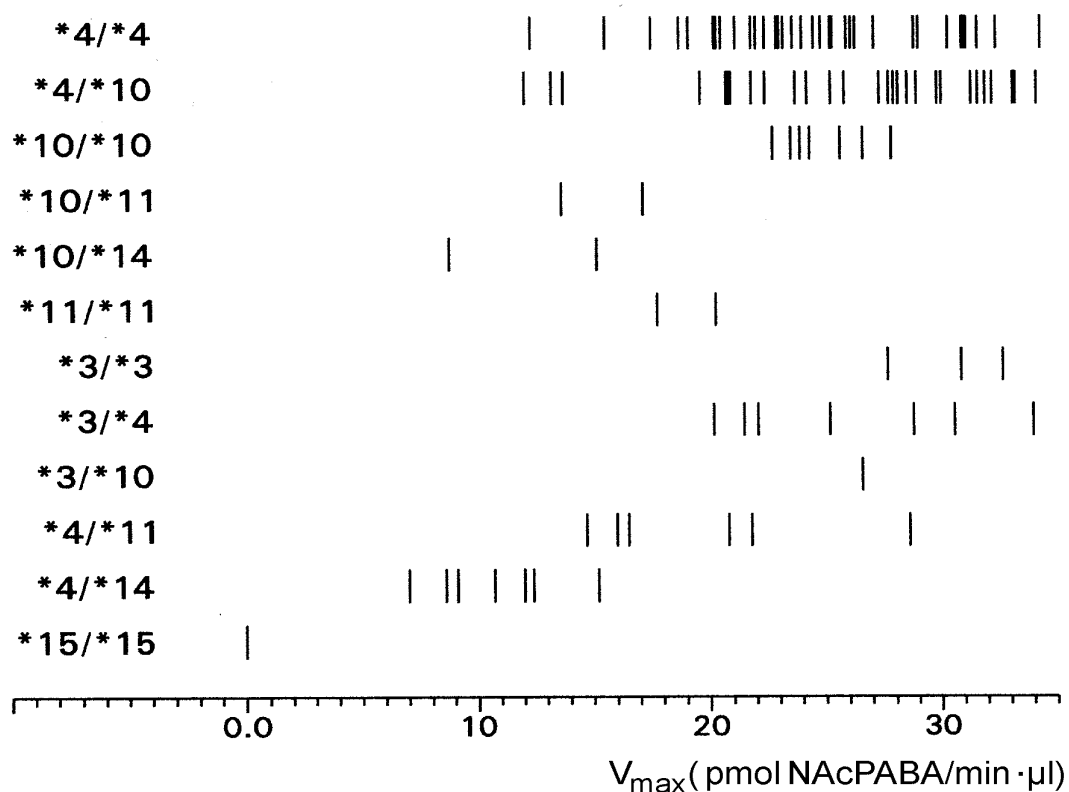
(1998) lag der K_m -Wert für einen homozygoten Träger des Wildtyp-Allels bei 186 μM PABA, für einen Probanden mit dem Genotyp $\text{NAT1}^*4/^*14B$ bei 157 μM und für einen Probanden mit dem Genotyp $\text{NAT1}^*4/^*17$ bei 198 μM . Es war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen diesen drei Werten vorhanden.

Tab. 38: Mediane und Spannweiten (Range) der V_{\max} - und K_m -Werte der untersuchten Probanden in Bezug zu ihrem Genotyp.

Genotyp	n	V_{\max} (pmol NAcPABA/ min· μl Hämolysat)	V_{\max} (pmol NAcPABA/ min·mg Hb)	K_m ($\mu\text{mol/l}$)
$\text{NAT1}^*3/^*3$	3	30.9 (27.7 – 32.7)	210.2 (165.9 – 215.1)	20.1 (19.3 – 45.8)
$\text{NAT1}^*4/^*3$	7	25.2 (20.2 – 34.0)	170.3 (122.8 – 196.5)	18.0 (15.9 – 22.1)
$\text{NAT1}^*10/^*3$	1	26.6	177.3	17.7
$\text{NAT1}^*4/^*4$	37	24.1 (12.4 – 34.4)	158.1 (81.0 – 227.8)	20.6 (8.2 – 49.7)
$\text{NAT1}^*4/^*10$	28	27.6 (13.1 – 34.2)	175.0 (85.8 – 255.2)	22.6 (9.4 – 48.0)
$\text{NAT1}^*10/^*10$	8	25.1 (22.8 – 28.6)	178.1 (152.0 – 196.8)	21.3 (17.4 – 34.4)
$\text{NAT1}^*4/^*11$	6	16.5 (14.7 – 21.8)	126.0 (95.5 – 142.5)	20.0 (12.7 – 26.3)
$\text{NAT1}^*10/^*11$	2	15.5 (13.7 – 17.2)	97.1 (87.3 – 106.8)	32.1 (28.9 – 35.3)
$\text{NAT1}^*11/^*11$	2	19.1 (17.8 – 20.3)	122.5 (111.3 – 133.6)	12.9 (11.8 – 13.9)
$\text{NAT1}^*4/^*14A$	7	10.7 (7.0 – 15.2)	72.3 (36.3 – 104.8)	25.9 (12.5 – 49.1)
$\text{NAT1}^*10/^*14A$	3	12.1 (8.8 – 15.2)	78.6 (62.4 – 89.4)	20.8 (16.5 – 49.2)
$\text{NAT1}^*15/^*15$	1	0	0	n.b.

Bezüglich V_{\max} ist auch mit Blick auf Abb. 30 ein schwacher Trend zu höheren Werten bei Trägern des NAT1^*3 -Allels sowie ein deutlicher Trend zu niedrigeren V_{\max} -Werten bei Trägern der Allele NAT1^*11 und NAT1^*14A erkennbar. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde geprüft, ob die Unterschiede in den V_{\max} -Werten der Individuen jeweils zweier NAT1 -Genotypen ($\text{NAT1}^*4/^*4$ versus $\text{NAT1}^*4/^*10$, $\text{NAT1}^*4/^*4$ versus $\text{NAT1}^*10/^*10$ usw.) signifikant sind (siehe Tab. 39).

NAT1-Genotyp


 Abb. 30: V_{\max} -Werte der hinsichtlich NAT1 phänotypisierten Probanden (n = 105).

 Tab. 39: Statistischer Vergleich der V_{\max} -Werte (bezogen auf mg Hämoglobin) der NAT1-Genotypen (Mann-Whitney-U-Test).

NAT1	NAT1								
	*3/*3	*4/*3	*4/*4	*4/*10	*10/*10	*4/*11	*10/*11	*11/*11	*4/*14
*3/*3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
*4/*3	n.s.	—	—	—	—	—	—	—	—
*4/*4	0.08	n.s.	—	—	—	—	—	—	—
*4/*10	n.s.	n.s.	n.s.	—	—	—	—	—	—
*10/*10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	—	—	—	—	—
*4/*11	0.02	n.s.	0.01	<0.01	<0.01	—	—	—	—
*10/*11	0.08	0.04	0.03	0.04	0.04	0.10	—	—	—
*11/*11	0.08	n.s.	0.10	0.07	<0.01	n.s.	n.s.	—	—
*4/*14	0.02	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.08	0.04	—
*10/*14	0.05	0.02	<0.01	0.01	0.01	0.02	n.s.	n.s.	n.s.

Im folgenden sollen die Ergebnisse der Geno- und Phänotypisierung der Probanden hinsichtlich NAT1 im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Studien diskutiert werden.

NAT1*3-Allel. In vorliegenden Untersuchungen wurden drei homozygote sowie acht heterozygote Träger des NAT1*3-Allels phänotypisiert. Die Mediane der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (siehe Tab. 38) lagen höher als bei den homozygoten Trägern des Wildtyp-Allels. Es war ein monotoner Trend einer ansteigenden Reaktionsgeschwindigkeit von NAT1*4/*4- über NAT1*3/*4- zu NAT1*3/*3-Probanden zu verzeichnen. Zwischen den Probanden mit den Genotypen NAT1*4/*4 und NAT1*3/*3 konnte hinsichtlich V_{\max} ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,08$) gefunden werden. Außerdem wurden die V_{\max} -Werte aller Träger mindestens eines NAT1*3-Allels ($n = 11$) mit den V_{\max} -Werten der homozygoten Träger des Wildtyp-Allels ($n = 37$) verglichen (Mann-Whitney-U-Test). Es ergab sich ein Unterschied an der Grenze zur Signifikanz ($p = 0,11$).

Die Punktmutation C¹⁰⁹⁵A im NAT1*3-Allel befindet sich sowohl außerhalb der kodierenden Region als auch des mRNA-Polyadenylierungssignals. Aus der Literatur sind keine Untersuchungen zur funktionellen Relevanz dieser Mutation bekannt. Es wird eine vergleichbare NAT1-Aktivität bei Individuen mit den Genotypen NAT1*3/*3, NAT1*3/*4 und NAT1*4/*4 angenommen (Bouchardy *et al.*, 1998). Ob das von NAT1*3 kodierte Enzym, wie hier in einer sehr kleinen Stichprobe gezeigt, tatsächlich eine erhöhte Acetylierungskapazität besitzt, bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären.

NAT1*4-Allel. In vorliegender Studie besaßen 37 Probanden den NAT1*4/*4-Genotyp. Die Spannweite der V_{\max} -Werte der homozygoten Träger des NAT1*4-Allels ist relativ groß (siehe Tab. 38). Ähnliche Befunde wurden auch von anderen Autoren erhalten. In einer Studie von Payton und Sim (1998) mit 18 NAT1*4/*4-Probanden lag die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Umsetzung von PABA in Erythrozyten des aktivsten Probanden ca. beim 2,5fachen der Aktivität des am geringsten aktiven. Die Ursachen dafür müssen in weiterführende Studien geklärt werden.

Es könnte auch ein Zusammenhang zwischen dem Folsäuregehalt der Blutproben und der NAT1-Aktivität bestehen. Ward *et al.* (1995) wiesen mit in *E. coli* exprimierter humaner NAT1 eine kompetitive Hemmung der Umsetzung von PABA durch Folsäure nach. Der Folsäuregehalt der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Blutproben war nicht bekannt.

NAT1*10-Allel. Bei vorliegenden Untersuchungen konnte zwischen Individuen mit den Genotypen *NAT1*4/*4*, *NAT1*4/*10* und *NAT1*10/*10* kein signifikanter Unterschied in der Acetylierungsgeschwindigkeit von PABA gefunden werden (Tab. 39). Im speziellen wurde kein Trend einer ansteigenden Reaktionsgeschwindigkeit von *NAT1*4/*4* über *NAT1*4/*10* zu *NAT1*10/*10* festgestellt (Tab. 38).

Die Punktmutationen in der nichtkodierenden 3'-Region des *NAT1*10*-Allels ($T^{1088}A$, $C^{1095}A$) haben keinen Aminosäureaustausch im Enzym zur Folge. Dennoch wurde in einigen Studien bei Trägern mindestens eines *NAT1*10*-Allels eine höhere Aktivität beobachtet. Die Ursache dafür wird darin gesehen, dass durch die Mutation $T^{1088}A$ im Polyadenylierungssignal der mRNA (AATAAA, Nukleotide 1086-1091) eine Verschiebung desselben in Richtung des 5'-Endes der DNA stattfindet, d.h. ein neues Polyadenylierungssignal zwischen den Nukleotiden 1083-1088 entsteht. Dies könnte zur Bildung einer stabileren mRNA und zur verstärkten Synthese von NAT1 führen (Badawi *et al.*, 1995, Fukutome *et al.*, 1999). Diese Hypothese konnte durch Untersuchungen von de Leon *et al.* (2000) nicht gestützt werden. Die Autoren fanden keine Unterschiede in der Sekundärstruktur der pre-mRNA von NAT1 4 und NAT1 10 sowie keinen Unterschied im Gehalt von NAT1 4- und NAT1 10-Protein nach Expression in COS-1-Zellen.

Badawi *et al.* (1995) bestimmten die NAT1-Aktivität mit PABA als Substrat im Zytosol der Blasenschleimhautzellen von 26 Probanden. Sie lag im Bereich zwischen 1,0 und 8,2 nmol NAcPABA/min·mg Protein. Beim Vergleich von 17 Individuen mit dem Genotyp *NAT1*4/*4* und acht Individuen mit dem Genotyp *NAT1*4/*10* hatte letztere Gruppe eine signifikant höhere Acetylierungskapazität ($p = 0,026$). In einer Studie zur NAT1-Aktivität in Dickdarmgewebe von Bell *et al.*

(1995a) wurden ähnliche Befunde erzielt. Die Aktivität lag zwischen 1,0 und ca. 50 nmol NAcPABA/min·mg Protein und war bei den 11 *NAT1*4/*10*-Individuen signifikant höher als bei den acht *NAT1*4/*4*-Individuen. Verglichen mit den Daten in vorliegender Arbeit ist die Aussagekraft der Studien von Badawi *et al.* und Bell *et al.* aufgrund der niedrigeren Probandenzahl geringer. Im Gegensatz zu den hier verwendeten relativ homogenen Blutproben kann die Zahl der Epithelialzellen in den Biopsien aus Blasen- und Dickdarmschleimhaut stark schwanken, so dass Unterschiede in der NAT1-Aktivität der Individuen auch durch diese Schwankungen erklärbar sind. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Mutationen im *NAT1*10* in verschiedenen Geweben unterschiedliche Konsequenzen aufgrund gewebeabhängiger Unterschiede in Transkriptionsfaktoren oder RNA-abbauenden Enzymen besitzen.

In einigen anderen Studien dagegen fand man zwischen *NAT1*4/*4*-, *NAT1*4/*10*- und *NAT1*10/*10*-Probanden keine signifikanten Unterschiede in der Acetylierung NAT1-spezifischer Substrate. Payton and Sim (1998) veröffentlichten eine Studie zur NAT1-Aktivität mit PABA als Substrat in Erythrozyten, in der keine signifikanten Unterschiede zwischen 18 *NAT1*4/*4* und zehn *NAT1*4/*10*-Individuen gefunden werden konnten. Hughes *et al.* (1998) verglichen in einer Studie den Quotienten aus acetylierter PAS und PAS im Urin von 144 Probanden mit deren Genotyp. Der Quotient NAcPAS/PAS spiegelt dabei wahrscheinlich der Ausmaß der NAT1-Expression in der Leber wider. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *NAT1*4/*4*-, *NAT1*4/*10*- und *NAT1*10/*10*-Individuen festgestellt werden.

NAT1*11-Allel. Im Hämolysat aller Träger des *NAT1*11*-Allels war bei vorliegenden Untersuchungen eine Tendenz zu geringeren maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Umsetzung von PABA zu beobachten. Der statistische Vergleich mit den homozygoten Trägern des Wildtyp-Allels ergab einen Unterschied an der Grenze zur Signifikanz ($p = 0,10$) zu den zwei homozygoten Trägern von *NAT1*11* sowie signifikante Unterschiede zu den acht heterozygoten Trägern des Allels ($p = 0,01$, $p = 0,03$, siehe Tab. 39). Wegen der relativ geringen Zahl von Individuen mit *NAT1*11*-Allel wurden zusätzlich die V_{\max} -Werte aller Träger mindestens eines *NAT1*11*-Allels ($n = 10$) mit den V_{\max} -Werten der

homozygoten Träger des Wildtyp-Allels ($n = 37$) verglichen. Es ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Weitere statistisch signifikante Unterschiede bestehen zu Individuen mit *NAT1*3*- und *NAT1*10*-Allelen (siehe Tab. 39). Vergleicht man die Mediane der V_{\max} -Werte der Individuen mit *NAT1*11*-Allel mit dem des Wildtyp-Allels, ergibt sich eine Verringerung der maximalen Geschwindigkeit der *N*-Acetylierung von PABA (in pmol/min·mg Hb) um 22,5% für *NAT1*11/*11*-Individuen, um 38,6% für *NAT1*10/*11*- und um 20,3% für *NAT1*4/*11*-Individuen. Diese Ergebnisse entsprechen nicht der Erwartung, wonach die Reaktionsgeschwindigkeit für homozygote Träger des mutierten Allels am stärksten verringert sein sollte. Weitere Untersuchungen mit größeren Stichproben sind notwendig.

Das *NAT1*11*-Allel kodiert ein Enzym mit veränderter Aminosäuresequenz. Im Vergleich zu *NAT1 4* besitzt *NAT1 11* in Position 149 Isoleucin anstelle Valin (bedingt durch die Mutation $G^{445}A$) und in Position 214 Alanin anstelle Serin (bedingt durch die Mutation $T^{640}G$). Nach den aktuellen Nomenklaturempfehlungen (Tab. 10) wird derzeit zwischen den Allelen *NAT1*11A* und *NAT1*11B* unterschieden. Die Mutation $C^{1095}A$ ist bei *NAT1*11B* im Gegensatz zu *NAT1*11A* nicht vorhanden. Andere Autoren unterscheiden die beiden Allele nach dem Vorhandensein der Mutation $G^{445}A$ (Doll *et al.*, 1997, Johnson and Sim, 2000). Bis zur endgültigen Klärung der Nomenklatur wurden die entsprechenden Allele der hier untersuchten Probanden einheitlich mit *NAT1*11* bezeichnet.

Erste Struktur-Funktions-Untersuchungen der *NAT1* lassen vermuten, dass das aktive Zentrum des Enzyms in der Region zwischen den Aminosäuren 47 und 111 liegt. Für die Region zwischen den Aminosäuren 112 und 210 konnte eine Bedeutung für die Affinität von *NAT1* zum Substrat *p*-Aminosalicylsäure nachgewiesen werden (Dupret *et al.*, 1994). Falls dieser Befund auch auf andere Substrate übertragbar wäre, könnten Veränderungen in der Aminosäuresequenz dieser Region, wie bei *NAT1*11* vorliegend, einen Einfluss auf die Affinität zwischen Enzym und Substrat und damit den K_m -Wert haben. Ein statistischer Vergleich der K_m -Werte aller Individuen mit dem Genotyp *NAT1*4/*4* mit den K_m -Werten aller Individuen mit mindestens einem *NAT1*11*-Allel ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-U-Test).

Bisherige Untersuchungen zur funktionellen Relevanz der *NAT1**11-Mutationen erbrachten differenzierte Ergebnisse; Berechnungen enzymkinetischer Parameter wurden von anderen Autoren bisher nicht durchgeführt. Payton and Sim (1998) beobachteten im Erythrozytenlysat eines *NAT1**4/*11-Probanden bei Verwendung von PABA als Substrat eine deutlich geringere NAT1-Aktivität verglichen mit 18 *NAT1**4/*4- und zehn *NAT1**4/*10-Individuen. Die mittlere NAT1-katalysierte Umsetzung von PABA (7,6 nmol NAcPABA/min·µmol Hb) aller Individuen (n = 35) einer Studie von Risch *et al.* (1996) war etwa doppelt so groß wie die eines einzelnen Individuums mit dem *NAT1**4/*11-Genotyp. *In vitro*-Studien mit rekombinantem humanem NAT1-Protein, exprimiert in *E. coli*, zeigten eine geringere Aktivität des Genprodukts des *NAT1**11-Alleles (914 nmol/min·U) im Vergleich mit dem Genprodukt des Wildtyp-Allels (968 nmol/min·U), allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant (Hughes *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu war in einer Studie von Doll *et al.* (1997) die *N*-Acetylierung von PABA, PAS, Benzidin, 2-Aminofluoren, 4-Aminobiphenyl und β -Naphtylamin durch ein rekombinantes humanes NAT1 11-Enzym (*E. coli*) durchschnittlich um das 1,6fache höher als bei dem rekombinanten NAT1 4. Die *O*-Acetylierung von *N*-Hydroxy-2-Aminofluoren und die *N,O*-Acetylierung von *N*-Hydroxy-2-Acetylaminofluoren waren in dieser Studie bei NAT1 11 im Vergleich zu NAT1 4 ebenfalls signifikant erhöht. De Leon *et al.* (2000) fanden keine funktionellen Unterschiede zwischen rekombinantem humanen NAT1 4 und NAT1 11 bei Verwendung von PAS als Substrat.

***NAT1**14-Allel.** Bezüglich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten bei der *N*-Acetylierung von PABA bestand bei den hier untersuchten sieben Individuen mit dem Genotyp *NAT1**4/*14 und den drei Individuen mit dem Genotyp *NAT1**10/*14 im Vergleich zu den *NAT1**4/*4-Probanden jeweils ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$). Auch zu Individuen mit den Genotypen *NAT1**3/*3, -*3/*4, -*4/*10, -*10/*10 und -*4/*11 wurden signifikante Unterschiede ermittelt (siehe Tab. 39). Ein Vergleich der Mediane der V_{\max} -Werte (in pmol/min·mg Hb) ergab eine Verringerung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit für *NAT1**4/*14-Individuen um 54,3% und für *NAT1**10/*14-Individuen um 50,3% im Vergleich zu homozygoten Trägern des Wildtyp-Allels.

Nach den derzeit gültigen Nomenklatur-Empfehlungen für *NAT1*-Allele (Tab. 10) wird zwischen dem Allel *NAT1*14B* mit der Mutation G⁵⁶⁰A und dem Allel *NAT1*14A* mit den zusätzlichen Mutationen T¹⁰⁸⁸A und C¹⁰⁹⁵A unterschieden. G⁵⁶⁰A ist die Ursache für einen Aminosäureaustausch in Position 187 des Enzyms, wobei Arginin durch Glutamin ersetzt ist. Diese Veränderung liegt außerhalb des vermuteten aktiven Zentrums des Enzyms (siehe oben). Dupret *et al.* (1994) fanden jedoch eine Bedeutung der Region zwischen den Aminosäuren 112 und 210 für die Affinität von NAT1 zum Substrat *p*-Aminosalicylsäure. Wenn dieser Befund auch auf andere Substrate übertragbar wäre, könnte der Arginin-Glutamin-Austausch in NAT1 14 in Position 187 zu einer Veränderung des entsprechenden K_m-Wertes führen. Beim statistischen Vergleich der K_m-Werte aller Individuen dieser Studie mit einem *NAT1*14*-Allel mit den K_m-Werten der homozygoten Träger des Wildtyp-Allels konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test).

Zur funktionellen Relevanz der Mutationen im *NAT1*14*-Allel liegen derzeit nur wenige Daten vor. Butcher *et al.* (1998) bestimmten die NAT1-Aktivität mit PABA als Substrat in Leukozyten von 85 Individuen, drei von ihnen besaßen den *NAT1*4/*14*-Genotyp. Deren mittlere V_{max}-Werte (9,1 nmol NAcPABA/min·mg Protein) waren signifikant niedriger als die mittleren V_{max}-Werte der homozygoten Träger des Wildtyp-Allels (19,7 nmol NAcPABA/min·mg Protein, n = 78). Diese Reduktion der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bei den *NAT1*4/*14*-Individuen im Vergleich mit den *NAT1*4/*4*-Individuen beträgt 53,8% und steht damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen vorliegender Studie. In der Studie von Payton and Sim (1998) besaß der Proband mit dem *NAT1*4/*14*-Genotyp ebenfalls eine deutlich verringerte NAT1-Aktivität im Vergleich zu 18 *NAT1*4/*4*- und zehn *NAT1*4/*10*-Probanden. Bei *in vitro*-Studien mit rekombinantem humanem NAT1-Protein, exprimiert in *E. coli*, war beim Genprodukt des *NAT1*14*-Allels nur etwa ein Viertel der Aktivität des Genprodukts des Wildtyp-Allels messbar (Hughes *et al.*, 1998)

***NAT1*15*-Allel.** Im Hämolsat des homozygoten *NAT1*15*-Individuums war kein Substratumsatz messbar. Das völlige Fehlen der NAT1 15-Aktivität als Folge einer

Synthese eines verkürzten, funktionslosen Proteins konnte im Rahmen dieser Arbeit in humanem Gewebe erstmalig nachgewiesen werden.

Die Mutation C⁵⁵⁹T in der proteinkodierenden Region des *NAT1**15-Allels führt zu einem Stopkodon in Position 187 und damit zur Synthese eines im C-Terminus um 103 Aminosäuren verkürzten Proteins. Obwohl damit das vermutete aktive Zentrum von NAT1 zwischen den Aminosäuren 47 - 111 erhalten bleibt, weist das verkürzte Protein keine enzymatische Aktivität auf.

Hughes *et al.* (1998) testeten die NAT1-Aktivität im Gesamtblut-Lysat von 20 Individuen mit PAS als Substrat. Der V_{\max} -Wert des Probanden mit dem *NAT1**14/*15-Genotyp (0,26 nmol NAcPAS/min·ml Lysat) was 93mal geringer als die mittleren Werte der übrigen 19 Probanden, die Träger der Allele *NAT1**4, *NAT1**10 und *NAT1**11 waren. In einem rekombinanten humanen *NAT1**15-Protein (*E. coli*) konnte keine NAT1-Aktivität nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Anwesenheit mindestens eines *NAT1**3-Alleles bei Individuen der vorliegenden Studie mit einer leicht erhöhten Geschwindigkeit der *N*-Acetylierung von PABA verbunden war. Wegen der relativ geringen Zahl von Probanden sind jedoch weitere Untersuchungen zur Klärung der funktionellen Relevanz der Mutation C¹⁰⁹⁵A mit größeren Stichproben und anderen Substraten notwendig. Bei vorliegenden Untersuchungen konnte zwischen homozygoten *NAT1**4-Probanden und Individuen mit den Genotypen *NAT1**4/*10 und *NAT1**10/*10 kein signifikanter Unterschied in der Acetylierungsgeschwindigkeit von PABA gefunden werden. Die Allele *NAT1**11 und *NAT1**14 weisen Mutationen in der kodierenden und nichtkodierenden Region des *NA1*-Gens auf. Der mutationsbedingte Valin/Isoleucin-Aminosäure-Austausch in Position 149 und der Serin/Alanin-Austausch in Position 214 (*NAT1* 11) bewirkten eine intermediäre Verringerung von V_{\max} . Der Aminosäure-Austausch Arginin/Glutamin in Position 187 bedingt durch die Mutation G⁵⁶⁰A des *NAT1**14-Allels führte im Hämolysat der entsprechenden Probanden zu einer starken Verringerung der Acetylierungsgeschwindigkeit verglichen mit Trägern der Allele *NAT1**3, *4, *10 und *11. Das in Position 187 verkürzte Protein NAT1 15 ist inaktiv; eine *N*-Acetylierung von PABA war nicht messbar.

Auf Grundlage der Ergebnisse der Phänotypisierung wurden bei den Individuen dieser Studie vier NAT1-Phänotypen unterschieden: der hoch aktive, der intermediär aktive, der gering aktive und der defiziente Phänotyp (siehe Tab. 40).

Tab. 40: Postulierte Phänotypen aller Individuen dieser Studie (n = 314). Klassifizierung auf Grundlage der Phänotypisierung der Probanden, wobei nur ausgewählte Individuen der angegebenen Genotypen untersucht worden waren. *NAT1*4/*15* in Klammern, da kein Proband dieses Genotyps phänotypisiert wurde.

Phänotyp	Häufigkeit (%)	Genotypen
hoch aktiv	5,1	<i>NAT1*3/*3</i> , <i>NAT1*4/*3</i> , <i>NAT1*10/*3</i>
intermediär aktiv	83,8	<i>NAT1*4/*4</i> , <i>NAT1*4/*10</i> , <i>NAT1*10/*10</i>
gering aktiv	10,8	<i>NAT1*4/*11</i> , <i>NAT1*10/*11</i> , <i>NAT1*11/*11</i> <i>NAT1*4/*14</i> , <i>NAT1*10/*14</i> , (<i>NAT1*4/*15</i>)
defizient	0,3	<i>NAT1*15/*15</i>

Individuen mit mindestens einem *NAT1*3*-Allel wurden aufgrund der vorliegenden Ergebnisse dem hoch aktiven Phänotyp zugeordnet, wobei berücksichtigt werden muss, dass der Stichprobenumfang gering war und im statistischen Vergleich der V_{\max} -Werte nur zwischen *NAT1*3/*3* und *NAT1*4/*4* ein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Es war jedoch ein monotoner Trend einer ansteigenden Acetylierungsgeschwindigkeit von *NAT1*4/*4*- über *NAT1*3/*4*- zu *NAT1*3/*3*-Individuen zu erkennen. Dem intermediär aktiven Phänotyp wurden Träger der Allele *NAT1*4* und *NAT1*10* zugeordnet. Zum gering aktiven Phänotyp wurden Individuen mit mindestens einem *NAT1*11*- oder *NAT1*14*-Allel gerechnet. Der homozygote Träger des *NAT1*15*-Allels war phänotypisch defizient.

Nach den bisher vorliegenden Erkenntnissen zur funktionellen Relevanz von *NAT1*-Allelen (vgl. Tab. 12) könnten weitere Genotypen den Phänotypen in Tab. 40 zugeordnet werden. Zu einem hoch aktiven Phänotyp könnte das Vorhandensein der relativ seltenen Allele *NAT1*21*, *NAT1*24* und *NAT1*25* führen. In Untersuchungen von Lin *et al.* (1998) besaßen die in *E. coli* exprimierten entsprechenden Enzyme eine 2-3fach höhere Aktivität im Vergleich zu *NAT1 4*. Einen gering aktiven Phänotyp besitzen nach bisherigen Erkenntnissen

möglicherweise Träger der Allele *NAT1*16* und *NAT1*17*. Obwohl die Mutationen in *NAT1*16* keinen Aminosäureaustausch im Enzym zur Folge haben, führten die Veränderungen in der 3'-UTR-Region des Gens (AAA-Insertion nach dem Nukleotid 1091, C¹⁰⁹⁵A) in Untersuchungen von de Leon *et al.* (2000) sowohl zur verringerten Acetylierungskapazität als auch zu einem um die Hälfte verringerten Proteingehalt von NAT1 16 in COS-1-Zellen. Bei *NAT1*17* ist die verringerte Aktivität wahrscheinlich auf den Aminosäureaustausch (Arg⁶⁴Trp) im postulierten aktiven Zentrum des Enzyms zurückzuführen. Delomenie *et al.* (1994) hatten gezeigt, dass diese Aminosäure essentiell für die katalytische Funktion von NAT1 ist. Im Hämolyat von vier Individuen mit dem Genotyp *NAT1*4/*17* in einer Studie von Butcher *et al.* (1998) konnte nur eine sehr geringe Umsetzung von PABA festgestellt werden. In Untersuchungen von Lin *et al.* (1998) war keine Umsetzung von PAS durch das in *E. coli* exprimierte humane Enzym NAT1 17 messbar. Zur funktionellen Relevanz des Asparagin-Valin-Aminosäureaustauschs in Position 251 bei *NAT1*22* liegen bisher kaum Erkenntnisse vor. In Untersuchungen von Lin *et al.* (1998) war keine Umsetzung von PAS durch das in *E. coli* exprimierte Enzym NAT1 22 messbar. Die Bedeutung der Mutation C⁹⁷T in *NAT1*19* für die Enzymfunktion wurde bisher noch nicht untersucht. Es könnte sich um ein funktionsloses Protein handeln, da es bedingt durch ein Stopkodon in Position 33 extrem verkürzt vorliegt. Das homozygote Vorliegen von *NAT1*19* und *NAT1*22* im Genotyp würde demnach zum defizienten Phänotyp führen.

3.2.4 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Diskussion der Methodik von Genotypisierung und Phänotypisierung

Bedingt durch die immer weiter Vervollkommnung der PCR-Technik lässt sich mittels Genotypisierung mit einer geringen Menge an Untersuchungsmaterial schnell und präzise der Genotyp eines Individuums hinsichtlich eines polymorphen Enzyms bestimmen. Bei Kenntnis der funktionellen Relevanz der Allele kann auf diese Weise die individuelle Metabolisierungsgeschwindigkeit eines Substrats abgeschätzt werden. Bei genetischen Polymorphismen arzneistoffmetabolisierender Enzyme könnte die Anwendung kommerziell erhältlicher Genotypisierungstests vor Beginn einer Pharmakotherapie eine individuelle Dosisanpassung ermöglichen. Ein Nachteil der Genotypisierung besteht darin, dass noch unbekannte Mutationen mit etablierten PCR-Methoden nicht erkannt werden und gegebenenfalls eine falscher Genotyp zugeordnet wird.

Wie in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, erlaubt die Phänotypisierung *ex vivo* bei Anwendung moderner, automatisierbarer Verfahren wie beispielsweise der HPLC mit geringem Aufwand eine Charakterisierung der tatsächlichen Enzymfunktion. Die Aktivität des Enzyms kann durch Induktion oder Hemmung gegenüber der nach Genotypisierung abgeschätzten Aktivität verändert sein. Derartige Einflüsse auf die Enzymfunktion können nur durch Phänotypisierung des Probanden oder Patienten erkannt werden. Beispielsweise war in einer Studie von Warholm *et al.* (1995) im Hämolysat von zwei Probanden auch nach wiederholter Analyse trotz des Vorhandenseins mindestens eines *GSTT1**A-Allels keine Enzymaktivität nachweisbar. Die kombinierte Anwendung von Genotypisierung und Phänotypisierung erlaubt die höchste Sicherheit bei der Abschätzung der Metabolisierungskapazität eines Individuums hinsichtlich eines spezifischen Substrats.

Konsequenzen der genetischen Polymorphismen von GSTT1-1 und NAT1 für die Probanden dieser Studie

Verglichen mit anderen Biotransformationsenzymen wie beispielsweise CYP2D6, das an der Biotransformation einer großen Zahl von Arzneimitteln beteiligt ist, hat

der genetische Polymorphismus von GSTT1-1 und NAT1 für die Pharmakotherapie nach bisherigen Erkenntnissen nur eine geringe Bedeutung. Beide Enzyme sind jedoch an der Entgiftung und metabolischen Aktivierung von Karzinogenen beteiligt. Daher kann sich eine diesbezügliche Exposition bedingt zum Beispiel durch bestimmte Lebens- und Ernährungsgewohnheiten oder ein entsprechendes berufliches Umfeld auf ein Individuum in Abhängigkeit von seinem GSTT1- bzw. NAT1- Genotyp unterschiedlich auswirken.

Konsequenzen des GSTT1-1-Polymorphismus. Wie in Kapitel 2.1.4 ausführlich dargestellt, werden die pathophysiologischen und toxikologischen Konsequenzen des GSTT1-1-Polymorphismus derzeit teilweise kontrovers diskutiert. Übereinstimmung besteht jedoch in der Auffassung, dass die ohnehin als negativ bekannten Effekte des Rauchens auf den menschlichen Organismus durch eine GSTT1-Gendefizienz noch verstärkt werden könnten. Es wurde nachgewiesen, dass Ethylenoxid, ein Bestandteil des Zigarettenrauchs, SCEs und HEV erzeugt und dass deren Zahl bei enzymdefizienten Rauchern im Vergleich zu enzymdefizienten Nichtraucherern signifikant erhöht ist (Hallier *et al.*, 1993, Schröder *et al.*, 1995, Müller *et al.*, 1998, Thier *et al.*, 1999b). Überraschend sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse einer Studie von Li *et al.* (2000), wonach das KHK-Risiko für GSTT1-1-aktive Raucher erhöht war. Bei der komplexen Pathogenese der KHK spielen jedoch möglicherweise andere Einflussfaktoren eine größere Rolle. Es ist zudem nicht erwiesen, dass die Entgiftung potentieller Karzinogene aus dem Zigarettenrauch überwiegend von GSTs vermittelt wird (Strange and Fryer, 1999). Zum Risiko einer beruflich bedingten Exposition mit halogenierten Kohlenwasserstoffen wie beispielsweise Dichlormethan lassen die bisherigen Erkenntnisse keine eindeutigen Schlussfolgerungen zu.

Konsequenzen des NAT1-Polymorphismus. Neben Ethylenoxid und halogenierten Kohlenwasserstoffen enthält Zigarettenrauch verschiedene aromatische und heterozyklische Amine wie 4-Aminobiphenyl, β -Naphthylamin, IQ und PhIP. Das Zusammenwirken von CYP1A2, PHS und NATs bei der Biotransformation dieser Substanzen kann zur Bildung von Arylnitrenium-Ionen führen, die DNA-Addukte bilden. Hein *et al.* (1993) konnten nachweisen, dass der

N,O-Acetyltransfer bei *N*-Hydroxy-4-acetyl-aminobiphenyl überwiegend von NAT1 katalysiert wird. Auch bestimmten Ernährungsgewohnheiten wie der häufige Verzehr von gekochtem Fleisch oder Fisch wird als ein Risikofaktor für genetische Schäden betrachtet, da aus den durch die Zubereitung gebildeten heterozyklischen Aminen wie PhIP, MeIQ, MeIQx, Glu-P2 und IQ ebenfalls Arylnitrenium-Ionen gebildet werden können.

In vorliegender Studie wies der homozygote Träger des *NAT1**15-Allels eine Enzymdefizienz auf. Auch homozygote Träger der Allele *NAT1**19 und *NAT1**22 besitzen vermutlich einen defizienten Phänotyp, was in weiteren Studien zu bestätigen wäre. Die normaldosierte Verabreichung von Arzneimitteln wie PAS oder Sulfamethoxazol kann für einen NAT1-defizienten Patienten toxikologische Konsequenzen haben. Die größte Bedeutung bei der Elimination von Sulfonamiden besitzt die *N*-Acetylierung und anschließender Ausscheidung über die Niere. Ein weiterer Biotransformationsweg, die *N*-Oxidation von Sulfamethoxazol durch Cytochrom P450-Isoenzyme, führt zu *N*-Hydroxylaminen, die in toxische Nitroso-Metaboliten umgewandelt werden (Rieder *et al.*, 1995). Diese Metaboliten sind wahrscheinlich für hypersensible Reaktionen wie Hautrötung, Erythembildung und Fieber während einer Sulfonamid-Therapie verantwortlich. Bei NAT1-enzymdefizienten Individuen dürften diese Symptome in äußerst verstärkter Form auftreten, da der Entgiftungsweg über die *N*-Acetylierung nicht vorhanden ist.

Konsequenzen verschiedener *GSTT1*-*NAT1*-Kombinationen. Im Rahmen vorliegender Arbeit wurden aus einem Gesamtkollektiv von 314 Probanden 140 Individuen hinsichtlich *GSTT1*-1 und 105 hinsichtlich NAT1 phänotypisiert. In Tab. 41 findet sich eine Zusammenstellung derjenigen Probanden, bei denen beide Phänotypisierungen durchgeführt wurden. Die Kombination des enzymdefizienten *GSTT1*-1-Phänotyps mit dem hoch aktiven NAT1-Phänotyp in einem Individuum würde bei bestimmten Lebens- und Ernährungsgewohnheiten (Rauchen und häufiger Verzehr von gekochtem oder gegrillten Fleisch) nach bisherigen Erkenntnissen zu einem höheren Risiko für genetische Schädigungen führen.

Falls in weiteren Untersuchungen bestätigt wird, dass Träger mindestens eines *NAT1**3-Allels dem hoch aktiven Phänotyp zugeordnet werden können, besteht für den Probanden mit der Kombination *NAT1**3/*4/*GSTT1**0/0 ein erhöhtes Risiko. Für die in Tab. 41 ebenfalls grau unterlegten Probanden wäre unter o.g. Voraussetzungen das Risiko intermediär erhöht.

Tab. 41: Genotypen und Phänotypen der 48 Probanden, die im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich *NAT1* und *GSTT1*-1 phänotypisiert wurden.

GSTT1-1	NAT1								
	hoch aktiv			intermediär aktiv			gering aktiv		
	<i>*3/*3</i>	<i>*3/*4</i>	<i>*3/*10</i>	<i>*4/*4</i>	<i>*4/*10</i>	<i>*10/*10</i>	<i>*4/*11</i>	<i>*11/*11</i>	<i>*4/*14</i>
defizient <i>GSTT1</i> *0/0	-	1	-	3	1	2	-	1	-
intermediär aktiv <i>GSTT1</i> *A/0	1	2	-	10	5	3	3	1	1
hoch aktiv <i>GSTT1</i> *A/A	-	1	1	4	6	1	1	-	-

Ausblick

Die Erforschung des genetischen Polymorphismus der humanen Biotransformationsenzyme *GSTT1*-1 und *NAT1* steht noch am Anfang; es ist zu erwarten, dass in den nächsten Jahren zahlreiche weitere *NAT1*-Allele identifiziert bzw. die Unklarheiten bezüglich der Struktur der bereits bekannten (z. B. *NAT1**11) beseitigt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass auch von *GSTT1* weitere Allelvarianten existieren. Bisher sind Punktmutationen in den Genen von GST-Isoenzymen nur bei *GSTM1* identifiziert worden (Hayes *et al.*, 1989).

Bezüglich der phänotypischen Konsequenzen der *GSTT1*- und *NAT1*-Genotypen sind die Ergebnisse bisheriger Studien teilweise widersprüchlich. Die kombinierte Anwendung von Genotypisierung und Phänotypisierung, wie in vorliegender Arbeit realisiert, ermöglicht eine besonders sichere Aussage zur Metabolisierungskapazität eines Individuums hinsichtlich eines Substrats.

Ein großes Interesse besteht an der Erforschung des Einflusses der genetischen Polymorphismen von *GSTT1*-1 und *NAT1* auf das individuelle Krebsrisiko eines Individuums. Es muss jedoch stets in Betracht gezogen werden, dass bei der

Entgiftung bzw. metabolischen Aktivierung von potentiellen Karzinogenen zahlreiche andere Enzyme mit GSTT1-1 und NAT1 interagieren. Es wird daher empfohlen, in epidemiologischen Studien den Einfluss der Polymorphismen von Glutathion-S-Transferasen, Cytochrom P450-Isoenzymen und Arylamin-N-Acetyltransferasen auf die Empfindlichkeit eines Individuums gegenüber einer Erkrankung simultan zu erfassen (Strange and Fryer, 1999).

4 Experimenteller Teil

4.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Für die vorliegenden Untersuchungen standen die Blutproben von insgesamt 314 gesunden, freiwilligen Probanden im Alter zwischen 19 und 48 Jahren zur Verfügung. 284 Individuen waren männlich, 30 weiblich. Ihre schriftliche Einverständniserklärung lag vor. Alle Probanden wurden hinsichtlich *NAT1*, 300 zufällig ausgewählte Individuen (270 männliche, 30 weibliche) hinsichtlich *GSTT1* genotypisiert. Zur Phänotypisierung hinsichtlich *GSTT1-1* wurden von den 300 genotypisierten Individuen 140 (136 männlich, 4 weiblich) zufällig ausgewählt. Zur Phänotypisierung hinsichtlich *NAT1* erfolgte eine gezielte Auswahl von 105 ausschließlich männlichen Probanden. Es handelt sich dabei einerseits um solche mit den selteneren *NAT1*-Genotypen und andererseits um eine repräsentative Zahl von Individuen mit dem *NAT1*4/*4*- bzw. *NAT1*4/*10*-Genotyp. Die Entnahme des Blutes erfolgte nach Venenpunktion in Röhrchen mit EDTA-beschichteten Polystyrolkügelchen (Monovetten®). Die Proben wurden bei –80°C gelagert.

4.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die Monovetten® zur Blutentnahme stammen von der Firma Sarstedt. Alle anderen Verbrauchsmaterialien wie PCR-Gefäße, Einmal-Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße verschiedener Volumina u.a. wurden von den Firmen Eppendorf, Biozym und Falcon bezogen. Die verwendeten Geräte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Gerät	Hersteller
Thermocycler <i>GeneAmp PCR System</i> 9600 und 9700	Perkin Elmer/Applied Systems
Flachbett-Elektrophoresekammern und Elektrophorese-Spannungsgeräte	Pharmacia, Biorad, Hoefer
diverse Gefriertruhen	Foron, GFL Burgwedel
diverse Waagen	Sartorius
diverse Pipetten	Eppendorf
pH-Messgerät	WTW, Weilheim
Dosierspritze	Hamilton
Thermomixer 5437	Eppendorf
Minishaker MS1	IKA Jahnke & Kunkel
Ultraschallbad Sonorex RK 1000	Bandelin electronics, Berlin
Temperierbad TS 2	IKA Jahnke & Kunkel
Ultraschallstab Sonoplus UW 70	Bandelin electronics, Berlin
Kühlzentrifuge Hermle ZK 380	Hermle, Gosheim
Micro-Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
UV-VIS-Spektrofotometer UV 2101 PC	Shimadzu
HPLC-Anlage: Lichrograph 6200 A Gradienten-Pumpe, L-4500 Diodenarray-Detektor, Autosampler AS 2000 A	Merck/Hitachi
HPLC-Säule RP 18, 250 x 4,6 mm, 5 µm Hypersil TM , RP-18-Vorsäulen	Shandon

4.3 Chemikalien

Bezeichnung	Reinheitsgrad	Hersteller
dNTPs		MBI Fermentas
DNA-Polymerase <i>AmpliTaq</i> TM		Perkin Elmer, Amersham
diverse PCR-Oligonukleotid-Startmoleküle (Primer)	Gelfiltration	TIB MOLBIOL
diverse DNA-Marker		MBI Fermentas
Agarose		Gibco BRL
Restriktionsendonukleasen		New England Biolabs, MBI Fermentas
Glutathion, reduzierte Form, freie Säure	99%	Sigma
Formaldehydlösung	37%	Ferak, Berlin
Dichlormethan	99,9%	Sigma
Acetylaceton, Ammoniumchlorid, Ammoniumacetat, Kaliumhydrogencarbonat, Natriumchlorid, Natriumacetat, Essigsäure, EDTA, Perchlorsäure, Trichloressigsäure, SDS, TRIS, Ficoll-400, Magnesiumchlorid, Salzsäure, NaOH, Citronensäure	zur Analyse	Merck, Sigma, Pharmacia
Phenol-Lösung (gebrauchsfertiges Phenol-Chloroform-Wasser-Gemisch)	<i>gradient grade</i>	Perkin Elmer
Ethanol, 2-Propanol, Chloroform, Isoamylalkohol	<i>gradient grade</i>	Merck
Proteinase K		Boehringer Mannheim
Ethidiumbromid	95%	Sigma
Bromphenolblau, Na-salz		Sigma
Hämoglobin-Testkit „Merckotest“		Merck
Methanol, Acetonitril	<i>HPLC grade</i>	Merck
Triethanolamin, freie Base	99 %	Sigma
o-Nitrophenol		Sigma
2,4-Dinitrophenylhydrazin		Sigma
p-Aminobenzoessäure, freie Säure	99,9%	Sigma
p-Acetamidobenzoessäure, p-Acetamidophenol	99 %	Sigma
D,L-Dithiothreitol	99 %	Sigma
Acetyl Coenzym A, Na-salz	95%	Sigma
Carnitin-O-Acetyltransferase		Sigma
Acetyl-D,L-Carnitin	99%	Sigma

4.4 Methoden

4.4.1 Genotypisierung hinsichtlich *GSTT1*

Leukozyten-Isolation

Erythrozyten-Lysis-Puffer (10 x):

61,5 g NH_4Cl (Endkonzentration 1,15 M)

10 g KHCO_3 (0,1 M)

2 ml 0,5 M EDTA (1 mM)

Aqua bidest. ad 1000 ml

TEN-Puffer (10 x):

2,4 g TRIS/HCl pH 7,5 (0,2 M)

400 μl EDTA (0,02 M)

17,5 g NaCl (0,3 M)

Aqua bidest. ad 1000 ml

Vier Volumenteile 1x Lysis-Puffer wurden mit einem Volumenteil EDTA-Blut in sterilen Reaktionsgefäßen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (2 000 g, 4°C, 30 min) wurde der Überstand entfernt, das Pellet in 1,5 ml 1 x TEN-Puffer gelöst und bei –20°C bis zur DNA-Extraktion aufbewahrt.

DNA-Extraktion

TE-Puffer:

121 mg TRIS-HCl (10 mM)

200 μl 0,5 M EDTA, pH 8,0 (1 mM)

Aqua bidest. ad 100 ml

Die aufgetaute Zellsuspension wurde mit 100 μl 20%iger SDS-Lösung und 100 μl Proteinase K-Lösung (2 mg Proteinase K in 100 μl 1 x TEN-Puffer gelöst) versetzt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (40 min⁻¹) inkubiert. Im ersten Extraktionsschritt wurde ein Volumenteil dieser Lösung mit einem Volumenteil Phenol-Lösung in geeigneten Reaktionsgefäßen gemischt und 3 h bei 30 min⁻¹ überkopf geschüttelt. Nach Zentrifugation (5 min, 4 000 g) und dabei erfolgter

Phasentrennung wurde die obere, DNA-haltige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, 1:1 mit Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (49:1, v/v) versetzt und 1 h bei 30 min^{-1} überkopf geschüttelt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (5 min, 4 000 g) wurde die obere, DNA-haltige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. 100 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (40,8 g Natriumacetat in 100 ml Aqua bidest. gelöst und mit Essigsäure auf pH 5,5 eingestellt) und das dreifache Volumen 96%iger Ethanol wurden zugegeben und gut vermischt. Die DNA wurde dann durch Zentrifugation (10 min, 4000 g) gefällt und der flüssige Überstand entfernt. Ein zweiter Fällungsschritt mit 3 ml 70%igem Ethanol und Zentrifugation wie oben schloß sich an. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das DNA-Pellet getrocknet, in 600 µl TE-Puffer gelöst und bei 5°C über Nacht unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurde die DNA-Lösung bei 4°C aufbewahrt.

Als Kriterium für die Reinheit der isolierten DNA diente der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm (Optimum 1,8 - 2,0). Die Quantifizierung der DNA erfolgte spektrofotometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$A_{260} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

A_{260} = Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm

ϵ = Extinktionskoeffizient 1/50 (µl/ng) für doppelsträngige DNA

d = Schichtdicke 1 cm

ergibt sich

$$c_{\text{DNA}} (\text{ng}/\mu\text{l}) = A_{260} \cdot 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Der DNA-Gehalt lag bei Extraktion nach diesem Verfahren bei 150 - 400 ng/µl.

Polymerase-Kettenreaktion

Reaktionsansatz (25 µl):

- 1 µl genomische DNA
- 2,5 µl 10 x PCR-Puffer
- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,625 µl GT1-F1-Primer Theta-f (10 µmol/ml)
- 0,625 µl GT1-R2-Primer Theta-r (10 µmol/ml)
- 0,3 µl Primer BNF3
- 0,3 µl Primer BNF5
- 2,5 µl dNTPs (2 mM)
- 16,45 µl Aqua bidest.
- 0,2 µl *AmpliTaq*TM

Temperaturzyklus: 2 min 94°C, 35x (30 s 94°C – 30 s 66°C – 1 min 72°C), 7 min 72°C, 4°C.

Tab. 42: Sequenzen und Positionen der zur Identifizierung des *GSTT1*-Gens verwendeten Primer.

Primer	Primer-Position (nt)	Ausrichtung	Primer-Sequenz
GT1	469 – 491	„vorwärts“	5' – TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC – 3'
GT2	723 – 704	„rückwärts“	5' – TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA – 3'
BNF3	(-40) – (-21)	„vorwärts“	5' – GCC ACA GGA GCT TCT GAC AC – 3'
BNF5	130 – 111	„rückwärts“	5' – GGC ACA ACA GGT AGT AGG CG – 3'

Agarose-Gelelektrophorese

10 x TBE-Puffer:

- 109 g TRIS (900 mM)
- 55 g Borsäure (900 mM)
- 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (20 mM)

Mit 1 M HCl wurde auf einen pH von 8,0 eingestellt und mit Aqua bidest auf 1 l aufgefüllt. Ein 1 x TBE-Puffer wurde durch 1:10-Verdünnung dieser Lösung mit Aqua bidest erhalten.

Ethidiumbromid-Lösung: 100 mg Ethidiumbromid wurden in 100 ml Aqua bidest. gelöst; 10 µl dieser Stammlösung wurden mit 1 x TBE-Puffer auf 100 ml aufgefüllt.

2,5% Agarose-Gel: Zu 2,5 g Agarose wurden 100 ml 1 x TBE-Puffer gegeben und die Mischung in der Mikrowelle zweimal aufgekocht. Durch Rühren wurde die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt und mit 10 µl Ethidiumbromid-Lösung pro 100 ml versetzt. Das flüssige Gel wurde in den mit Klebestreifen abgedichtete Elektrophoreseschlitten gefüllt. Nach Einsetzen der Elektrophoresekämme zur Ausbildung der Probenaschen wurde das Gel zunächst 10 min bei Raumtemperatur, dann 15 min bei 4°C abgekühlt.

Probenlaufpuffer:

15 g Ficoll-400

0,25 g Bromphenolblau

Mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen und unter Rühren lösen.

Elektrophoresebedingungen: 90 min Laufzeit, 120 V.

4.4.2 Genotypisierung hinsichtlich *NAT1*

Primer

Tab. 43: Sequenzen und Positionen der zur Identifizierung der *NAT1*-Mutationen verwendeten Primer.

Primer	Primer-Position (nt)	DNA-Abschnittslänge (bp)	Primer-Sequenz	Spezifität
N1-IR	-7 - -39	409	5'-CTA AgC AAg GAA AAC AAA ACG AAA GCA AAT AAT	<i>Maell</i> -site (3') -344 <i>Sspl</i> -site (3') -40
N1-IIR	1125 - 1096	435	5'-TTC CAA GAT AAC CAC AGG CCA TCT TTA GAA	<i>Bbsl</i> -site (3') 1095
N1-1F	-415 - -394	-	5'-GAA ATT GAG TGG GTC AGG TAC C	<i>NAT1</i> -gene (5')
N1-4F	344 - 364	247	5' – AtG GCA GGA ACT ACA TTG TCG	
N1-5F	691 - 710	-	5'-GTT CAC TGT TtG GTG GGC TT	<i>Bbsl</i> -site (5') 1095
N1-5R	1125 - 1106	1540	5'-TTC CAA GAT AAC CAC AGG CC	<i>NAT1</i> -gene (3')
N1-6F	-16 - -4	-	5'-TCC TTG CTT AGG GGA TCA TG	<i>NAT1</i> -gene (5')
N1-6R	861 - 840	878	5'-AAA TCT ATC ACC ATG TTT GGG C	<i>NAT1</i> -gene (3')
N1-6R	1108 - 1088	418	5'- GCC ATC TTT AAA ATA CAT TTA	1088T (3')
N1-7R	1108 - 1088	418	5'- GCC ATC TTT AAA ATA CAT TTT	1088A (3')
N1-8R	556 - 590	247	5' – CGA GGC TTA AGA GTA AAG GAG TAG ATG TCT	

RestriktionsenzymeTab. 44: Restriktionsendonukleasen zur Erkennung der *NAT1*-Mutationen.

Mutation	Präamplifikation DNA-Abschnitt Primer	Restriktions- endo- nuklease	Erken- nungs- sequenz	Schnitt- positionen (nt) Wildtyp Mutation	entstandene DNA-Fragmente (bp) Wildtyp Mutation
C ⁻³⁴⁴ T	409 bp N1-1F/N1-1R	<i>Maell</i>	A'CG_T	-345 keine	71 338 409
A ⁻⁴⁰ T	409 bp N1-1F/N1-1R	<i>Sspl</i>	AAT'ATT	keine -40	409 376 33
C ¹⁹⁰ T	878 bp N1-6F/N1-6R	<i>Tsp590I</i>	'AATT_	26 52 410 520 597 732 26 52 186 410 520 597 732	358 139 129 110 73 43 26 224 139 134 129 110 73 43 26
G ⁴⁴⁵ A	878 bp N1-6F/N1-6R	<i>BbsI</i>	GAA GAC(N) ₂	438 551 551	455 310 113 568 310
G ⁴⁵⁹ A	1540 bp N1-1F/ N1-5R	<i>BsII</i>	CCnn_nnn 'nnGG	-10 132 456 686 687 847 -10 132 686 687 847	406 324 278 230 160 141 1 554 406 278 160 141 1
C ⁵⁵⁹ T	247 bp N1-4F/N1-8R	<i>Ddel</i>	C'TnA_G	431 431 558	159 88 127 88 32
G ⁵⁶⁰ A	247 bp N1-4F/N1-8R	<i>A/w26I</i>	GTCTCn'n nnn_	554	211 36 247
T ⁶⁴⁰ G	1540 bp N1-1F/N1-5R	<i>A/wNI</i>	CAG_nnn' CTG	402 402 643	817 723 817 482 241
A ⁷⁵² T	878 bp N1-6F/N1-6R	<i>BglII</i>	A'GATC_T	750 -	767 111 878
A ¹⁰⁹⁵ C	435 bp N1-5F/N1-11R	<i>BbsI</i>	GAAGACn n'nnnn_	- 1086	435 396 39

Identifizierung der Allele NAT1*3, NAT1*4, NAT1*10 und NAT1*11

Amplifikation eines 1540 bp-DNA-Abschnittes. Zunächst wurde ein NAT1-spezifischer 1540 bp-DNA-Abschnitt, der die 3'- und 5'-Regionen des Exons enthält, mittels PCR amplifiziert.

PCR-Reaktionsbedingungen:

1 µl genomische DNA
5 µl 10x Taq-Puffer
5 µl 2 mM dNTPs
1 µl 10 µM 5'-Primer N1-1F
1 µl 10 µM 3'-Primer N1-5R
33 µl Aqua bidest.
0,2 µl *AmpliTaq*TM
4,8 µl 25 mM MgCl₂

Temperaturzyklus: 2 min 94°C, (30 s 94°C, 1 min 62°C, 2 min 72°C), 7 min 72°C, 35 Zyklen

Elektrophoresebedingungen:

1,2% Agarose, 120 V, 20 min, Auftragung von 7 µl Amplifikat und 3 µl Probenpuffer, Marker VI.

Mutation G⁴⁵⁹A. Zur Identifizierung dieser Mutation wurde der präamplifizierte DNA-Abschnitt mit dem Restriktionsenzym *BsI* inkubiert („verdaut“).

Ansatz:

12,5 µl präamplifizierte DNA
0,75 µl *BsI*
2,5 µl NEBuffer 2
9,5 µl Aqua bidest.

Inkubation über Nacht bei 55°C im Brutschrank.

Elektrophoresebedingungen:

2% Agarose, 80 V, 60 min, Auftragung von 25 µl Verdau und 10 µl Probenpuffer (Marker V).

Mutation T⁶⁴⁰G. Zur Identifizierung dieser Mutation wurde der präamplifizierte DNA-Abschnitt mit dem Restriktionsenzym *A/wNI* verdaut.

Ansatz:

12,5 µl präamplifizierte DNA
0,5 µl *A/wNI*
2,5 µl NEBuffer 4
9,5 µl Aqua bidest.

Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Elektrophoresebedingungen:

2 % Agarose, 80 V, 60 min, Auftragung von 25 µl Verdau und 10 µl Probenpuffer (Marker V).

Das verbliebene Amplifikat wurde durch Zugabe von 162 µl Aqua bidest. ca. 1:10 auf ein Endvolumen von ca. 180 µl verdünnt.

Amplifikation eines 409 bp-DNA-Abschnitts. In dieser Verdünnung wurde ein 409 bp-Abschnitt amplifiziert, mit dem die Mutationen A⁻⁴⁰T und C⁻³⁴⁴T identifiziert werden konnten. Bezüglich A⁻⁴⁰T wurde ein *mismatch*-Primer (N1-IR) verwendet, der im Falle der Mutation zur Entstehung einer *SspI*-Schnittstelle führte.

PCR-Reaktionsbedingungen:

1 µl 1:10 verdünnte, präamplifizierte DNA
5 µl 10x Taq-Puffer
5 µl 2 mM dNTPs
1 µl 10 µM 5'-Primer N1-1F
1 µl 10 µM 3'-Primer N1-IR
33 µl Aqua bidest.
0,2 µl *AmpliTaq*TM
4,8 µl 25 mM MgCl₂

Temperaturzyklus: 2 min 94°C, (0.5 min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C), 7 min 72°C, 14 Zyklen

Elektrophoresebedingungen:

2 % Agarose, 120 V, 20 min, Auftragung von 7 µl Amplifikat und 3 µl Probenpuffer (Marker V).

Mutation C⁻³⁴⁴T. Der 409 bp-Abschnitt wurde mit dem Restriktionsenzym *Maell* verdaut.

Ansatz:

125 µl präamplifizierte DNA

0,5 µl *Maell*

12,5 µl Puffer

Inkubation über Nacht bei 50°C im Brutschrank.

Elektrophoresebedingungen:

2 % Agarose, 80 V, 60 min, Auftragung von 5 µl Verdau und 10 µl Probenpuffer (Marker V).

Mutation A⁻⁴⁰T. Der 409 bp-DNA-Abschnitt wurde mit dem Restriktionsenzym *Sspl* verdaut.

Ansatz:

12,5 µl präamplifizierte DNA

0,5 µl *Sspl*

2,5 µl NEBuffer *Sspl*

9,5 µl Aqua bidest.

Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Elektrophoresebedingungen:

3% Nusieve[®] 3:1 Agarose, 80 V, 120 min, Auftragung von 25 µl Verdau und 10 µl Probenpuffer (Marker V).

Mutation T¹⁰⁸⁸A . Diese Mutation wurde mittels allelspezifischer PCR nach Amplifikation eines 418 bp-DNA-Abschnitts identifiziert.

PCR-Reaktionsbedingungen:

1 µl 1:10 verdünnte, präamplifizierte DNA
2,5 µl 10x Taq-Puffer
2,5 µl 2 mM dNTPs
0,5 µl 10 µM 5'-Primer N1-5F
0,5 µl 10 µM 3'-Primer N1-6R bzw. N1-7R
16,5 µl Aqua bidest.
0,1 µl *AmpliTaq*TM
2,4 µl 25 mM MgCl₂

Temperaturzyklus: 2 min 94°C (0.5 min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C), 7 min 72°C, 14 Zyklen.

Elektrophoresebedingungen:

2% Agarose, 120 V, 20 min, Auftragung von 7 µl Amplifikat und 3 µl Probenpuffer (Marker V).

Mutation C¹⁰⁹⁵A. Diese Mutation wurde nach Amplifikation eines 435 bp-DNA-Abschnitts und anschließendem Verdau mit *BbsI* identifiziert.

PCR-Reaktionsbedingungen:

1 µl 1:10 verdünnte, präamplifizierte DNA
2,5 µl 10x Taq-Puffer
2,5 µl 2 mM dNTPs
0,5 µl 10 µM 5'-Primer N1-5F
0,5 µl 10 µM 3'-Primer N1-IIR
16,5 µl Aqua bidest.
0,1 µl *AmpliTaq*TM
2,4 µl 25 mM MgCl₂

Temperaturzyklus: 2 min 94°C (0.5 min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C), 7 min 72°C, 14 Zyklen.

Elektrophoresebedingungen:

2% Agarose, 120 V, 20 min, Auftragung von 7 µl Amplifikat und 3 µl Probenpuffer (Marker V).

Ansatz:

- 12,5 µl präamplifizierte DNA
- 0,5 µl *Bbsl*
- 2,5 µl NEBuffer 2
- 9,5 µl Aqua bidest.

Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Elektrophoresebedingungen:

3% Nusieve® 3:1 Agarose, 80 V, 120 min, Auftragung von 25 µl Verdau und 10 µl Probenpuffer (Marker V).

Mutation G⁴⁴⁵A. Der zur Identifizierung dieser in *NAT1*11* enthaltenen Mutation amplifizierte 878 bp-Abschnitt wurde außerdem für die Mutationen in den *NAT1*-Allelen *NAT1*17* und *NAT1*22* verwendet. Zur Identifizierung von G⁴⁴⁵A erfolgte anschließend der Verdau des 878 bp-Abschnitts mit dem Restriktionsenzym *Bbsl*.

PCR-Reaktionsbedingungen:

- 1 µl genomische DNA
- 5 µl 10x Taq-Puffer
- 5 µl 2 mM dNTPs
- 1 µl 10 µM 5'-Primer N1-6F
- 1 µl 10 µM 3'-Primer N1-6R
- 33 µl Aqua bidest.
- 0,2 µl *AmpliTaq*[™]
- 4,8 µl 25 mM MgCl₂

Temperaturzyklus: 2 min 94°C, (30 s 94°C, 30 s 60°C, 60 s 72°C), 7 min 72°C, 35 Zyklen.

Elektrophoresebedingungen:

1,2% Agarose, 120 V, 20 min, Auftragung von 7 µl Amplifikat und 3 µl Probenpuffer (Marker VI).

Ansatz:

12,5 µl präamplifizierte DNA
0,5 µl *Bbsl*
2,5 µl NEBuffer 2
9,5 µl Aqua bidest.

Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Elektrophoresebedingungen:

2% Agarose, 80 V, 60 min, Auftragung von 25 µl Verdau und 10 µl Probenpuffer (Marker V).

Identifizierung der Allele *NAT1*14* und *NAT1*15*

Zur Identifizierung der in diesen Allelen enthaltenen Mutationen wurde ein 247 bp-DNA-Abschnitt unter Verwendung der Primer N1-4F und N1-8R amplifiziert.

PCR-Reaktionsbedingungen:

6,0 µl 25 mM MgCl₂
5 µl 2 mM dNTPs
je 1 µl 10 µM 5'-Primer N1-4F und N1-8R
5 µl 10x Taq-Puffer
0,2 µl *AmpliTaq*TM
1 µl genomische DNA
31,8 µl Aqua bidest.

Temperaturprofil: 2 min 94°C, (30 s 94°C, 1 min 63°C, 30 s 72°C), 7 min 72°C, 35 Zyklen.

Mutation C⁵⁵⁹T. Der 247 bp-Abschnitt wurde mit dem Restriktionsenzym *Ddel* verdaut.

Ansatz:

12,5 µl präamplifizierte DNA
0,75 µl *Ddel*
2,5 µl NEBuffer 3
9,5 µl Aqua bidest.

Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Elektrophoresebedingungen:

2% Agarose, 80 V, 60 min, Auftragung von 25 µl Verdau und 10 µl Probenpuffer (Marker V).

Mutation G⁵⁶⁰A. Der 247 bp-Abschnitt wurde mit dem Restriktionsenzym *A/w26I* verdaut.

Ansatz:

12,5 µl präamplifizierte DNA
0,75 µl *A/w26I*
0,25 µl Rinderserumalbumin
2,5 µl Puffer Y
9,0 µl Aqua bidest.

Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Elektrophoresebedingungen:

2% Agarose, 80 V, 60 min Auftragung von 25 µl Verdau und 10 µl Probenpuffer (Marker V).

Identifizierung der Allele NAT1*17 und NAT1*22

Mutation C¹⁹⁰T. Zur Identifizierung dieser Mutation wurde der präamplifizierte 878 bp-DNA-Abschnitt mit *Tsp509I* verdaut.

Ansatz:

12.5 µl präamplifizierte DNA
0.5 µl *Tsp509I*
2.5 µl NEBuffer 1
9.5 µl Aqua bidest.

2 h bei 65°C im Brutschrank inkubieren.

Elektrophoresebedingungen:

2% Agarose, 80 V, 60 min, Auftragung von 25 µl Verdau und 10 µl Probenpuffer (Marker V).

Mutation A⁷⁵²T. Zur Identifizierung dieser Mutation wurde der präamplifizierte 878 bp-Abschnitt mit *Bgl*II verdaut.

Ansatz:

- 12.5 µl präamplifizierte DNA
- 0.5 µl *Bgl*II
- 2.5 µl NEBuffer 3
- 9.5 µl Aqua bidest.

Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Elektrophoresebedingungen:

2% Agarose, 80 V, 60 min, Auftragung von 25 µl Verdau und 10 µl Probenpuffer (Marker V).

4.4.3 Phänotypisierung hinsichtlich GSTT1-1

Puffer und Lösungen

- TRIS-HCl-Puffer, 20 mM, pH 7,4: Zunächst wurde eine 0,2 M TRIS-Lösung hergestellt, indem 24,23 g TRIS mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt wurden. Zu 25 ml dieser Lösung wurden 42 ml 0,1 N HCl-Lösung gegeben und mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde mit Aqua bidest. auf 250 ml aufgefüllt und der pH-Wert kontrolliert.
- Glutathion-Lösung, 12 mM: 36,9 mg GSH wurden in 10 ml TRIS-HCl-Puffer (20 mM, pH 7,4) gelöst.
- Trichloressigsäure-Lösung (20% m/V): 20 g Trichloressigsäure wurden in 100 ml Aqua bidest. gelöst.
- Formaldehyd-Lösung: 0,2000 - 0,4000 g der kommerziell erhältlichen Stammlösung (deklarerter Gehalt 37%, iodometrisch bestimmter Gehalt 40,5%) wurde in einen 100 ml-Maßkolben eingewogen und mit Aqua bidest. aufgefüllt. Diese Lösung wurde unter Verwendung eines 10 ml-Maßkolbens 1:10 (V/V) verdünnt. In 1 ml dieser Lösung waren je nach Einwaage zwischen 2,025 und 4,050 µmol Formaldehyd enthalten.

- Nash-Reagenz: 100 g einer 0,4%igen wässrigen Acetylacetonlösung wurden 30 g Ammoniumacetat und 600 µl Eisessig zugesetzt.
- Eluent Methanol:Wasser 55:45 (V/V): 55 ml Methanol und 45 ml Aqua bidest. wurden gemischt und 15 min im Ultraschallbad entgast.
- Interner Standard o-Nitrophenol (400 µM): 5,6 mg o-Nitrophenol wurden in 100 ml Eluent gelöst.
- 2,4-Dinitrophenylhydrazin (100 µM): 2,0 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden in 100 ml Eluent gelöst.
- 2,4-Dinitrophenylhydrazon (100 µM) als Vergleichssubstanz: 2,1 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazon wurden in 100,00 ml Eluent gelöst.

Inkubationsansätze

Zur Phänotypisierung der Probanden wurde individuelles Hämolysat mit drei Konzentrationen des spezifischen Substrates Dichlormethan inkubiert. Die 1 ml-Reaktionsansätze enthielten folgende Komponenten:

125 µl Hämolysat

333 µl GSH-Lösung (12 mM)

2, 4 bzw. 8 µl Dichlormethan (Endkonzentrationen 31, 62 und 124 mM)

TRIS-HCl-Puffer, 20 mM, pH 7,4, zu einem Gesamtvolumen von 1 ml ergänzt

In einem 2 ml-Eppendorf®-Gefäß wurden Hämolysat, Puffer und GSH-Lösung gemischt und 5 min bei 37°C in einem Eppendorf®-Thermomixer vorinkubiert. Anschließend wurde die Schüttelfrequenz (700/min) eingestellt und das Substrat mittels einer Hamilton®-Spritze zugegeben. Sofort nach Substratzugabe wurde der Inhalt des jeweiligen Reaktionsgefäßes mit 5 s gründlich gemischt. Für jeden Probanden wurden neun substrathaltige (drei pro Konzentration) und zwei substratfreie Ansätze (Puffer anstelle Substrat) hergestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit (90 min bei 37°C) erfolgte der Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 333 µl 20%iger Trichloressigsäure (m/V) und eine Zentrifugation der Proben (10 min, 15 000g). 1 ml des jeweiligen Überstandes wurde weiterverarbeitet (siehe unten).

Kalibrierung

Zur Erstellung der individuellen Kalibrierfunktion jedes Probanden wurden folgende Ansätze verwendet:

125 µl Hämolysat

333 µl GSH-Lösung (12 mM)

Volumen wässrige Formaldehydlösung, so dass Endkonzentrationen von 200, 400 und 600 µM Formaldehyd im Ansatz vorlagen

TRIS-HCl-Puffer, 20 mM, pH 7,4, zu einem Gesamtvolumen von 1 ml ergänzt.

Die Kalibrierproben wurden sofort nach der Herstellung mit 333 µl 20%iger Trichloressigsäure (m/V) versetzt, zentrifugiert und vermessen. Für jede individuelle Kalibriergerade wurden neun formaldehydhaltige Proben (drei je Konzentration) und zwei Leermatrixproben (Puffer anstelle Formaldehydlösung) hergestellt.

Bestimmung des Formaldehyds

Die Bestimmung des Formaldehyds erfolgte kolorimetrisch mit der Methode nach Nash (1963) bzw. mittels HPLC durch Detektion des bei der Reaktion von Formaldehyd mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin entstehenden 2,4-Dinitrophenylhydrazon nach Grömping und Cammann (1989).

Bestimmung nach Nash. Je 1 ml des nach Proteinfällung und Zentrifugation gewonnenen Überstandes wurde in ein verschließbares Reagenzglas überführt und mit 1 ml frisch zubereitetem Nash-Reagenz versetzt. Nach einer 30-minütigen Temperierung bei 60°C (Wasserbad) wurden die Proben sofort abgekühlt (Eisbad) und nach 15 min bei 415 nm gegen den Leerwert der Kalibrierfunktion gemessen.

Bestimmung mittels HPLC. In einem 2 ml-Eppendorf®-Gefäß wurden 0,5 ml des Überstandes mit 0,5 ml frisch zubereiteter 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (100 µM) gemischt und 45 min bei 37°C im Eppendorf®-Thermomixer inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden dazu 0,5 ml des internen Standards *o*-Nitrophenol (400 µM) gegeben.

HPLC-Bedingungen:

- Injektionsvolumen 50 µl (Autosampler)
- Isokratische Elution mit Methanol-Wasser-Gemisch (55:45, V/V), 1 ml/min
- Detektionswellenlänge: 350 nm

Methodenoptimierung und –validierung

Außer bei der Optimierung der Inkubationszeit wurden für alle Untersuchungen zur Methodenetablierung und –validierung 1 ml-Reaktionsansätze verwendet. Von den oben beschriebenen Ansätzen abweichende Zusammensetzungen sind in den jeweiligen Teilkapiteln bzw. Abbildungs- und Tabellenlegenden angegeben.

Optimierung der Inkubationszeit. Verschließbare 15 ml-Reagenzgläser enthielten folgende Inkubationsansätze:

3,0 ml Hämolytat
1,5 ml GSH (12 mM)
76,8 µl Dichlormethan (100 mM/Ansatz)
TRIS-HCl-Puffer (20 mM, pH 7,4) auf 12 ml ergänzt

Vor der Substratzugabe wurden die Ansätze 5 min bei 37°C im Wasserbad vorinkubiert. Nach der Substratzugabe und gründlichem Mischen wurde bei konstanter Temperatur zu folgenden Zeiten je 1 ml entnommen: 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180 min. Parallel dazu wurden Kontrollansätze mit hitzeinaktiviertem Hämolytat (60 min bei 100°C behandelt) mitgeführt.

4.4.4 Phänotypisierung hinsichtlich NAT1

Puffer und Lösungen

- 0,1 M Triethanolamin-Puffer, pH 7,5: Für 1 l Puffer wurden 320 ml 0,2 N HCl und 500 ml 0,2 M Triethanolamin-Lösung (29,8 g Triethanolamin/l) mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt und der pH-Wert überprüft. Darin wurden 693,5 mg Dithiothreitol (\square 4,5 mM) und 1,675 g Na-EDTA (\square 4,5 mM) gelöst.
- Acetyl-CoA-regenerierendes System: besteht aus o.g. Triethanolamin-Puffer, 20 mM D,L-Acetylcarnitin und 2 U/ml Carnitin-O-Acetyltransferase; 48 mg D,L-Acetylcarnitin und 20 U Carnitin-O-Acetyltransferase (μ l entsprechend der vorliegenden Aktivität) wurden auf 10 ml Puffer aufgefüllt.
- Acetyl-CoA: Für eine 450 μ M Lösung wurden 3,6 mg in 10 ml Aqua bidest. gelöst.
- Substratlösung: Eine 5 mM Stammlösung (79,6 mg PABA/100 ml Aqua bidest.) wurde 1:100, 1:50, 1:20 und 1:10 verdünnt; im Ansatz ergaben sich Konzentrationen von 10, 20, 50, und 100 μ M.
- Perchlorsäure-Lösung (15%): Zu 79 ml Aqua bidest. wurden 21 ml einer kommerziell erhältlichen 70%igen Perchlorsäure-Lösung gegeben.
- Vergleichssubstanz NAcPABA: Für eine 250 μ M Stammlösung wurden 4,5 mg NAcPABA in 100 ml Aqua bidest. gelöst.
- interner Standard: 7,6 mg *p*-Acetamidophenol werden in 100,00 ml Aqua bidest. gelöst (500 μ M).
- 0,1 M Citratpuffer, pH 3,5: Zunächst wurden eine 0,1 M Citronensäure-Lösung (21,0 g Citronensäure auf 1 l Reinst-Aqua bidest.) und eine 0,1 M Natriumcitratlösung (21 g Citronensäure und 200 ml 1 N NaOH mit Reinst-Aqua bidest. auf 1 l auffüllen) hergestellt. Für 1 l Puffer wurden 550 ml der Citronensäure-Lösung mit 450 ml der Natriumcitratlösung gemischt, filtriert und der pH-Wert kontrolliert.

- Eluent: 850 ml des 0,1 M Citratpuffers wurden mit 150 ml Acetonitril (V/V) gemischt und 15 min im Ultraschallbad entgast.

Inkubationsansätze

Zur Phänotypisierung der Probanden hinsichtlich NAT1 wurde individuelles Hämolysat mit vier Konzentrationen des spezifischen Substrates *p*-Aminobenzoesäure (PABA) inkubiert. In ein 2 ml-Eppendorf®-Gefäß wurden in der angegebenen Reihenfolge pipettiert und gemischt:

375 µl 0,1 M Triethanolamin-Puffer, pH 7,5
25 µl Hämolysat
200 µl Acetyl-CoA-regenerierendes System
200 µl Acetyl-CoA (450 µM)

Der Ansatz wurde genau 5 min bei 37°C im Eppendorf®-Thermomixer vorinkubiert. Dann wurden 200 µl der auf 37°C vortemperierten Substratlösung in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben, so dass Endkonzentrationen von 10, 20, 50 und 100 µM PABA im Ansatz vorlagen. Es wurde 5 s gründlich gemischt und 10 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Pro Substratkonzentration erfolgte eine Doppelbestimmung, zusätzlich wurden je Proband eine substratfreie Leerprobe (200 µl Aqua bidest. anstelle Substrat) und je Analysentag zwei Enzymkontrollproben mit 100 µM PABA mitgeführt. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 333 µl 15%iger Perchlorsäure versetzt, gründlich gemischt und 10 min bei 15 000g zentrifugiert.

Kalibrierung

Für die Ansätze wurden 25 µl Hämolysat, 575 µl Pufferlösung und 200 µl des Acetyl-CoA-regenerierenden System gemischt. Nach Zusatz von 333 µl 15 %iger Perchlorsäure (V/V) und gründlichem Mischen wurden je 100 µl PABA- und NAcPABA-Lösung zugefügt, so dass die Endkonzentrationen im Ansatz für PABA 10, 25 und 50 µM und für NAcPABA 5, 10 und 20 µM betrugen. Die Ansätze wurden 10 min bei 15 000g zentrifugiert.

Bestimmung der PABA- und NAcPABA-Konzentrationen

Nach der Zentrifugation wurden 900 µl des Überstandes mit 100 µl 500 µM *p*-Acetamidophenol-Lösung gemischt.

HPLC-Bedingungen:

- Injektionsvolumen 50 µl (Autosampler)
- Isokratische Elution mit 15% Acetonitril V/V in 0,1 M Citratpuffer pH 3,5, 1 ml/min;
- Detektionswellenlänge 270 nm

Zur Auswertung wurden die Peakhöhen (h) von PABA, NAPABA und dem internen Standard verwendet. Es wurden jeweils die Quotienten $h_{\text{PABA}}/h(\text{int. St.})$ und $h_{\text{NAcPABA}}/h(\text{int. St.})$ gebildet. Mittels linearer Regression wurden aus den Daten der Kalibrierproben jeweils für PABA und NAcPABA Kalibrierfunktionen erstellt.

Methodenoptimierung und –validierung

Für alle Untersuchungen zur Methodenetablierung und –validierung wurden 1 ml-Reaktionsansätze verwendet. Von den oben beschriebenen Ansätzen abweichende Zusammensetzungen sind in den jeweiligen Teilkapiteln bzw. Abbildungs- und Tabellenlegenden angegeben.

Prüfung auf nichtenzymatische Zersetzung von NAcPABA. NAcPABA-Konzentrationen: 8, 10, 20 µM/Ansatz, Doppelbestimmung, 1 Leerwert (Aqua bidest. anstelle NAcPABA)

Ansatz:

In ein Eppendorfgefäß werden in der angegebenen Reihenfolge pipettiert:

375 µl 0,1 M Triethanolamin-Puffer, pH 7,5

25 µl Hämolystat

200 µl Acetyl-CoA-regenerierendes System

200 µl Acetyl-CoA (450 µM)

Nach gründlichem Mischen wurden 333 µl 15%ige Perchlorsäure zugesetzt. Nach

Zugabe von 200 µl der auf 37°C vortemperierten Produktlösung wurde 5 s gemischt und 10 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert.

Prüfung auf enzymatische Zersetzung von NAcPABA. Es wurde der gleiche Ansatz wie bei der Prüfung auf nichtenzymatische Zersetzung verwendet. Der Ansatz wurde 5 min bei 37°C im Eppendorf-Thermomixer vorinkubiert. Dann wurden 200 µl der auf 37°C vortemperierten NAcPABA-Lösung zugegeben, so dass im Ansatz Konzentrationen von 2, 4, 8, 10 und 20 µM vorhanden waren. Nach 5 s Mischen wurde 10 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Abbruch der Reaktion und Weiterbehandlung erfolgten wie bei regulären Inkubationsansätzen.

Bestimmung des Hämoglobingehalts

Die Bestimmung des Hämoglobingehalts von Blutproben wurde unter Verwendung des Hämoglobin-Testkits Merckotest® von Merck durchgeführt. Sie beruht auf der Oxidation des Hämoglobins zu Hämoglobin durch Kaliumhexacyanoferrat-III-Lösung. Hämoglobin wird anschließend mit Kaliumcyanid-Lösung zu einem stabilen, bei 540 nm fotometrisch messbaren Komplex umgesetzt. Zur Kalibrierung wurden die im Testkit enthaltenen Hämoglobincyanid-Standardlösungen verwendet.

4.5 Datenverarbeitungsprogramme und statistische Testmethoden

Die Anpassung von Kurvenfunktionen an experimentell ermittelte Daten (lineare Regression, nichtlinearisiertes Kurvenfitting) erfolgte mit dem Programm MicrocalTM OriginTM Version 4.1 von Microcal Software Inc. Northhampton, USA.

Chemische Formeln wurden mit dem Programm C-Design[®], Version 2.2, FoBaSoft GmbH, Deutschland, gezeichnet.

Für alle statistischen Testmethoden sowie die Schätzung von Mittelwerten, Medianen und Vertrauensbereichen wurde das Computerprogramm SYSTATTM, Version 6.0.1, SPSS Inc. USA, verwendet.

χ^2 -Test, Zweiseitiger exakter Fisher-Test. Diese Tests wurden zur Erkennung der Signifikanz mit $p < 0,05$ bei unterschiedlichen Häufigkeiten verwendet. Der zweiseitige exakte Fisher-Test ist speziell für sehr kleine Stichprobenumfänge geeignet. Im Einzelnen wurde getestet auf:

- Signifikanz der Unterschiede in den Häufigkeiten des *GSTT*0/0*-Genotyps und verschiedener *NAT1*-Allele in ethnischen Gruppen,
- signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede in der Häufigkeit des *GSTT1*0/0*-Genotyps,
- signifikante Unterschiede zwischen der nach der Hardy-Weinberg-Regel erwarteten Häufigkeit von *GSTT1*- und *NAT1*-Allelen und den durch Genotypisierung bzw. Phänotypisierung ermittelten Häufigkeiten.

Mann-Whitney-U-Test. Der Mann-Whitney-U-Test ist ein nichtparametrisches Verfahren und damit geeignet für Stichproben mit nicht normalverteilten Beobachtungswerten. Er ist anwendbar bei kleinen Stichproben und unterschiedlichem Stichprobenumfang. Es wurde auf Signifikanz der Unterschiede in den V_{\max} - sowie K_m -Werten der Individuen jeweils zweier *NAT1*-Genotypen geprüft. $P < 0,10$ führte zur Ablehnung der Nullhypothese.

Test nach Kolmogoroff-Smirnoff. Die K_m -Werte der *GSTT1*-1-aktiven Probanden sowie die Einzelwerte der Kalibrierkonzentrationen von PABA und NAcPABA wurden dem Kolmogoroff-Smirnoff-Testverfahren „one sample“

unterzogen. Dabei wurde aus den experimentell ermittelten Daten eine empirische Verteilungsfunktion aufgestellt und mit der Verteilungsfunktion einer geschätzten Standardnormalverteilung verglichen. $P > 0,05$ führte zur Annahme der Nullhypothese.

5 Zusammenfassung

Die genetischen Polymorphismen der humanen Biotransformationsenzyme Glutathion-S-Transferase Theta 1 (GSTT1-1) und Arylamin-*N*-Acetyltransferase 1 (NAT1) wurden erst zu Beginn der neunziger Jahre entdeckt. Es besteht derzeit ein großes Interesse nicht nur am Auffinden neuer Mutationen, sondern vor allem an Untersuchungen zur Häufigkeit der Allele, zu deren phänotypischen Konsequenzen und pharmakologisch-toxikologischer Relevanz. Die in vorliegender Arbeit enthaltene Literaturübersicht dokumentiert den aktuellen Erkenntnisstand zu GSTT1-1 und NAT1 bezüglich Struktur der Enzyme, Rolle im humanen Stoffwechsel, Substratspezifitäten und genetischem Polymorphismus.

Für die Untersuchungen im experimentellen Teil der Arbeit standen die Blutproben von 314 gesunden, deutschen Probanden mit bekanntem *GSTT1*- und/oder *NAT1*-Genotyp zur Verfügung. Es wurden Methoden etabliert und validiert, um im Hämolysat die Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Umsetzung des GSTT1-1-spezifischen Substrats Dichlormethan sowie des NAT1-spezifischen Substrats *p*-Aminobenzoesäure mit vertretbarem Laboraufwand zu bestimmen. Hinsichtlich GSTT1-1 wurden 140 zufällig ausgewählte Probanden phänotypisiert. Bei 19,3% der Individuen war keine Umsetzung von Dichlormethan nachweisbar. Dieses Ergebnis stand in 100%iger Übereinstimmung mit den Befunden der Genotypisierung, wonach bei diesen Probanden eine homozygote *GSTT1*-Gendeletion vorlag. Bei 80,7% der Probanden war durch Genotypisierung mindestens ein *GSTT1**A-Allel identifiziert worden. Mit Hilfe der Phänotypisierung konnten in dieser Gruppe zwei Phänotypen voneinander abgegrenzt werden; 45,0% der Probanden waren unter den gegebenen Bedingungen intermediär, 35,7% der Probanden hoch aktiv. Damit bestand der Vorteil der Phänotypisierung darin, eine trimodale Verteilung der GSTT1-1-Aktivität nachweisen zu können. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig in einer größeren deutschen Population gezeigt.

Glutathion-S-Transferasen sind an der Entstehung von Zytostatika-Resistenzen beteiligt. Zwei Phosphonsäurediester des Glutathions, die sich als kompetitive bzw. nicht-kompetitive Hemmstoffe anderer GST-Isoenzyme erwiesen hatten,

sollten in vorliegender Arbeit bezüglich einer Hemmwirkung auf die GSTT1-1-vermittelte Umsetzung von Dichlormethan untersucht werden. Es wurde jedoch kein inhibitorischer Effekt festgestellt. Weiterführende Untersuchungen müssen klären, ob dieses Ergebnis auf eine Isoenzympezifität der beiden Substanzen zurückzuführen ist.

Tacrin, ein Arzneistoff zur Behandlung des Morbus Alzheimer, zeigte in vorliegender Arbeit nur eine unspezifische Hemmwirkung auf die GSTT1-1-vermittelte Umsetzung von Dichlormethan. Weiterführende Studien könnten zur Klärung der Frage beitragen, ob GSTT1-1 an der Entgiftung protein-reaktiver Tacrin-Metaboliten beteiligt ist und ob der genetische Polymorphismus dieses Enzyms dabei eine Rolle spielt.

Gegenwärtig sind 24 verschiedene *NAT1*-Allele bekannt, wobei einige davon sehr selten auftreten. In der hier verwendeten deutschen Population waren sechs *NAT1*-Allele identifiziert worden. Das Ziel der Phänotypisierung bestand darin, die funktionelle Konsequenz dieser Allele in den Blutproben von 105 gezielt ausgewählten Probanden zu bestimmen. Der Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Umsetzung des spezifischen Substrates *p*-Aminobenzoesäure erfolgte jeweils mit den homozygoten Trägern des am häufigsten vorkommenden Allels *NAT1*4* (Wildtyp-Allel). Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren war das Vorhandensein des Allels *NAT1*10* im Genotyp eines Probanden nicht mit einer erhöhten Umsetzung des Substrats verbunden. *NAT1*3* führte zu einem leicht erhöhten, bei homozygoten Trägern des Allels signifikant erhöhten Substratumsatz. Bei Probanden mit mindestens einem *NAT1*11*-Allel war die Reaktionsgeschwindigkeit um 20 - 40% verringert. Das Vorhandensein von *NAT1*14A* führte zu einer um die Hälfte verringerten Reaktionsgeschwindigkeit bei der Umsetzung von PABA. In vorliegender Arbeit wurde erstmalig für einen homozygoten Träger des *NAT1*15*-Allels das Fehlen jeglicher Enzymaktivität nachgewiesen.

GSTT1-1 und *NAT1* sind an der Entgiftung und metabolischen Aktivierung zahlreicher Karzinogene beteiligt. Aus diesem Grund haben aktuelle epidemiologische Studien die Aufklärung von Zusammenhängen zwischen den

genetischen Polymorphismen von *GSTT1-1* und *NAT1* sowie den Risiken von Krebserkrankungen oder genetischen Schädigungen zum Ziel. In derartigen Studien ist die Dokumentation der ethnischen Zusammensetzung der untersuchten Populationen bzw. die Verwendung ethnisch einheitlicher Stichproben von großer Bedeutung. Dies ist notwendig, da beispielsweise zwischen europäischen und amerikanischen Populationen einerseits und asiatischen Bevölkerungsgruppen andererseits große Unterschiede in der Häufigkeit verschiedener *GSTT1*- und *NAT1*-Allele bestehen. Bezüglich der Häufigkeit der *GSTT1*-Gendefizienz sowie des *NAT1*11*-Allels wurden in vorliegender Arbeit jedoch auch zwischen europäischen, d.h. einander ethnisch nahestehenden Bevölkerungsgruppen statistisch signifikante Unterschiede gefunden.

6 Literaturverzeichnis

- Abdel-Rahman, S.Z., El-Zein, R.A., Anwar, W.A. and Au W.W.: A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of *GSTM1* and *GSTT1* genes in population studies. *Cancer Lett* 107 (2) (1996), S. 229-233.
- Abdel-Rahman, S.Z., El-Zein, R.A., Zwischenberger, J.B. and Au, W.W.: Association of the *NAT1*10* genotype with increased chromosome aberrations and higher lung cancer risk in cigarette smokers. *Mutat Res* 398 (1998), S. 43-54.
- Abdel-Rahman, S.Z., Anwar, W.A., Abdel-Aal, W.E., Mostafa, H.M. and Au, W.W.: *GSTM1* and *GSTT1* genes are potential risk modifiers for bladder cancer. *Cancer Detect Prev* 22 (1998), S. 129-138.
- Aceto, A., Ilio, C., Lo Bello, M., Bucciarelli, T., Angelucci, S. and Federici, G.: Differential activity of human, rat, mouse and bacteria glutathione transferase isoenzymes towards 4-nitroquinoline 1-oxide. *Carcinogenesis* 11 (1990), S. 2267-2269.
- Ahmed, A.E. and Anders, M.W.: Metabolism of dihalomethanes to formaldehyde and inorganic halide. I. In vitro studies. *Drug Metab Disp* 4(4) (1976), S. 357-361.
- Ahmed, A.E. and Anders, M.W.: Metabolism of dihalomethanes to formaldehyde and inorganic halide. II. Studies on the mechanism of the reaction. *Biochem Pharmacol* 27 (1978), S. 2021-2025.
- Andersen, M.E., Clewell, H.J., Gargas, M.L., Smith, F.A. and Reutz, R.H.: Physiologically based pharmacokinetics and the risk assessment process for methylene chloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 87 (1987), S. 185-295.
- Anderson, K.E., Hammons, G.J., Kadlubar, F.F., Potter, J.D., Kaderlik, K.R., Ilett, K.F., Minchin, R.F., Teitel, C.H., Chou, H.C., Martin, M.V., Guengerich, F.P., Barone, G.W., Lang, N.P. and Peterson, L.A.: Metabolic activation of aromatic amines by human pancreas. *Carcinogenesis* 18 (1997), S. 1085-1092.
- Andres, H.H., Kolb, H.J., Schreiber, R.J. and Weiss, L.: Purification and physico-chemical properties of acetyl-CoA arylamine *N*-acetyltransferase from pigeon liver. *Biochim Biophys Acta* 746 (1983), S. 193-201.
- Andres, H.H., Klem, A.J., Szabo, S.M. and Weber, W.W.: New spectrophotometric and radiochemical assay for acetyl-CoA:arylamine *N*-acetyltransferase applicable to a variety of arylamines. *Anal Biochem* 145 (1985), S. 367-375.

- Andres, H.H., Klem, A.J., Schopfer, L.M., Harrison, J.K. and Weber, W.W.: On the active site of liver Acetyl-CoA. *J Biol Chem* 263(16) (1988), S. 7521-7527.
- Arias, J.M., Fleischner, G., Kirsch, R., Mishkin, S. and Gatmaitan, Z.: On the structure, regulation and function of ligandin. In: Arias, J.M. and Jacoby, W.B. (Eds): *Glutathione: metabolism and function*. Raven, New York 1976.
- Arruda, V.R., Gridnolli, C.E., Goncalves, M.S., Soares, M.C., Menezes, R., Saad, S.T. and Costa, F.F.: Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (*GSTM1*) and theta (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clin Genet* 54 (3) (1998), S. 210-214.
- Badawi, A.F., Hirvonen, A., Bell, D.A., Lang, N.P. and Kardlubar, F.F.: Role of aromatic amine acetyltransferase, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder. *Cancer Res* 55 (1995), S. 5230-5237.
- Balson, R., Gibson, P.R., Ames, D. and Bhathal, P.S.: Tacrine-induced hepatotoxicity. Tolerability and management. *CNS Drugs* 4 (1995), S. 168-181.
- Barbieri, B., Papadogiannakis, N., Eneroth, P., Söderstedt, A. Stain-Malmgren, R. and Olding, L.B.: *p*-Aminobenzoic acid, but not its metabolite *p*-acetamidobenzoic acid, inhibits thrombin induced thromboxane formation in human platelets in a non NSAID like manner. *Thrombosis Res* 86 (1997), S. 127-140.
- Barbieri, B., Stain-Malmgren, R. and Papadogiannakis, N.: *p*-Aminobenzoic acid and its metabolite *p*-Acetamidobenzoic acid inhibit agonist-induced aggregation and arachidonic acid-induced [Ca²⁺]_i transients in human platelets. *Thrombosis Res* 95 (1999), S. 235-243.
- Bartsch, H., Malaveille, C., Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P., Hautefeuille, A., Boyle, P. and the Int. Pancreatic Disease Study Group: Genetic polymorphism of *N*-acetyltransferases, glutathione S-transferase M1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in relation to malignant and benign pancreatic disease risk. *Eur J Cancer Prev* 7 (1998), S. 215-223.
- Becquemont, L., Lecoœur, S., Simon, T., Beaune, Ph., Funck-Brentano, Ch. and Jaillon, P.: Glutathione S-transferase Theta genetic polymorphism might influence tacrine hepatotoxicity in Alzheimer's patients. *Pharmacogenetics* 7 (1997), S. 251-253.
- Bell, D.A., Stephens, E.A., Castranio, T., Umbach, D.M., Watson, M., Deakin, M., Elder, J., Hendrickse, C., Duncan, H. and Strange, R.C.: Polyadenylation polymorphism in the acetyltransferase 1 gene (*NAT1*) increases risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 55 (1995a), S. 3537-3542.

- Bell, D.A., Badawi A.F., Lang, N.P., Ilett, K.F., Kadlubar, F.F. and Hirvonen, A.: Polymorphism in the *N*-Acetyltransferase 1 (*NAT1*) Polyadenylation Signal: Association of *NAT1*10* allele with higher *N*-Acetylation activity in bladder and colon tissue. *Cancer Res* 55 (1995b), S. 5226-5229.
- Berhane, K., Widersten, M., Engstrom, A., Kozarich, J.W. and Mannervik, B.: Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994), S. 1480-1484.
- Bhargava, M.M., Ohmi, N., Listowski, J. and Arias, J.M.: Subunit composition, organic anion binding, catalytic and immunological properties of ligandin from the rat testis. *J Biol Chem* 255 (1980), S. 724-727.
- Biehl, J.P.: Emergence of drug resistance as related to the dosage and metabolism of isoniazid. *Trans 16th Conf Chemother Tuberc*, Washington D.C. (1957), S. 108-113.
- Blackburn, A.C., Woollatt, E., Sutherland, G.R. and Board, P.G.: Characterization and chromosome location of the gene *GSTZ1* encoding the human Zeta class glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase. *Cytogenet Cell Genet* 83 (1998), S. 109-114.
- Blum, M., Grant, D.M., McBride, W., Heim, M. and Meyer, U.A.: Human arylamine *N*-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization and functional expression. *DNA Cell Biol* 9 (1990), S. 193-203.
- Board, P.G. and Webb, G.C.: Isolation of a cDNA clone and localization of human glutathione S-transferase 2 genes to chromosome band 6p12. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (1987), S. 2377-2381.
- Board, P.G., Webb, G.C. and Coggan, M.: Isolation of a cDNA clone and localization of human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Ann Hum Genet* 53 (1989), S. 205-213.
- Board, P.G., Baker, R.T., Chelvanayagam, G. and Jermini, L.S.: Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem J* 328 (1997), S. 929-935.
- Board, P.G.: Identification of cDNAs encoding two human alpha class glutathione transferases (*GSTA3* and *GSTA4*) and the heterologous expression of *GSTA4*. *Biochem J* 330 (1998), S. 827-831.
- Bogaards, J.J.P., van Ommen, B. and von Bladeren, P.J.: An improved method for the separation and quantification of glutathione S-transferase subunits in rat tissue using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 474 (1989), S. 435-440.

- Bouchardy, C., Mitrunen, K., Wikman, H., Husgafvel-Pursiainen, K., Dayer, P., Benhamou, S. and Hirvonen, A.: *N*-acetyltransferase NAT1 and NAT2 genotypes and lung cancer risk. *Pharmacogenetics* 8 (1998), S. 291-298.
- Brockmöller, J., Cascorbi, I., Kerb, R. and Roots, I.: Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine *N*-acetyltransferase 2, glutathione *S*-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and Cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res* 56 (1996), S. 3915-3925.
- Brockmöller, J., Cascorbi, I., Kerb, R., Sachse, Ch. And Roots, I.: Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition. *Toxicol Lett* 102/103 (1998), S. 173-183.
- Brüning, T., Lammert, M., Kempkes, M., Thier, R., Golka, K. and Bolt, H.M.: Influence of polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 for risk of renal cancer in workers with long-term high occupational exposure to trichlorethene. *Arch Toxicol* 71 (1997), S. 596-599.
- Buddecke, E.: *Grundriss der Biochemie*. 9. Auflage (1994), W. de Gruyter Berlin, New York. ISBN 3-11-012076-3.
- Buick, A.R., Doig, M.V., Jeal, S.C., Land, G.S. and McDowall, R.D.: Method validation in the bioanalytical laboratory. *J Pharm Biomed Anal* 8 (1990), S. 629.
- Butcher, N.J., Ilett, K.F. and Minchin, R.F.: Functional polymorphism of the human arylamine *N*-acetyltransferase type 1 gene caused by C190T and G560A mutations. *Pharmacogenetics* 8 (1998), S. 67-72.
- Butcher, N.J., Ilett, K.F. and Minchin, R.F.: Substrate-dependent regulation of human arylamine *N*-acetyltransferase-1 in cultured cells. *Mol Pharmacol* 57 (2000), S. 468-473.
- Campbell, E., Takahashi, Y., Abramowitz, M., Peretz, M. and Listowsky, I.: A distinct human testis and brain mu-class glutathione *S*-transferase. Molecular cloning and characterization of a form present even in individuals lacking hepatic type mu isoenzymes. *J Biol Chem* 265 (1990), S. 9188-9193.
- Campoli-Richards, D.M., Sorkin, E.M. and Heel, R.C.: Inosine Pranobex. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* 32 (1986), S. 383-424.
- Casanova, M., Bell, D.A. and Heck, H.D.: Dichloromethane metabolism to formaldehyde and reaction of formaldehyde with nucleic acids in hepatocytes of rodents and humans with and without glutathione *S*-transferase T1 and M1 genes. *Fundam Appl Toxicol* 37 (1997), S. 168-180.

- Cascorbi, I., Drakoulis, N., Brockmöller, J., Maurer, A., Sperling, K. and Roots, I.: Arylamine *N*-Acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Genet* 57 (1995), S. 581-592.
- Cascorbi, I., Brockmöller, J., Mrozikiewicz, P.M., Bauer, S., Loddenkemper, R. and Roots, I.: Homozygous rapid arylamine *N*-acetyltransferase (NAT2) genotype as a susceptibility factor for lung cancer. *Cancer Res* 56 (1996), S. 3961-3966.
- Cascorbi, I., Brockmöller, J., Mrozikiewicz, P.M., Müller, A. and Roots, I.: Arylamine *N*-acetyltransferase activity in man. *Drug Metab Rev* 31 (1999), S. 489-502.
- Causey, A.G., Hills, H.M. and Phillips, L.J.: Evaluation of criteria for the acceptance of bioanalytical data. *J Pharm Biomed Anal* 8 (1990), S. 625.
- Chan, K., Miners, J.C. and Birkett, D.J.: Direct and simultaneous high-performance liquid chromatographic assay for the determination of *p*-aminobenzoic acid and its conjugates in human urine. *J Chromatogr* 426 (1988), S. 103-109.
- Chasseaud, L.F.: The role of glutathione and glutathione *S*-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv Cancer Res* 29 (1979), S. 175-274.
- Chen, H., Sandler, D.P., Taylor, J.A., Shore, D.L., Liu, E., Bloomfield, C.D. and Bell, D.A.: Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (*GSTT1*) gene defect. *Lancet* 347 (1996), S. 295-297.
- Chen, C.L., Liu, Q. and Relling, M.V.: Simultaneous characterization of glutathione *S*-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics* 6 (2) (1996), S. 187-191.
- Chenevix-Trench, G., Young, J., Coggan, M. and Board, P.: Glutathione *S*-transferase M1 and T1 polymorphisms: susceptibility to colon cancer and age of onset. *Carcinogenesis* 16 (7) (1995), S. 1655-1657.
- Ciaccio, P.J., Tew, K.D. and Lacreata, F.P.: The spontaneous and glutathione *S*-transferase mediated reaction of chlorambucil with glutathione. *Cancer Commun* 2 (1990), S. 279-285.
- Ciaccio, P.J., Tew, K.D. and LaCreta, F.P.: Enzymatic conjugation of chlorambucil with glutathione by human glutathione *S*-transferases and inhibition by ethacrynic acid. *Biochem Pharmacol* 42 (1991), S. 1504-1507.
- Coggan, M., Whitbread, L., Whittington, A. and Board, P.: Structure and organization of the human Theta-class glutathione *S*-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. *Biochem J* 334 (1998), S. 617-623.

- Comstock, K.E., Johnson, K.J., Rifkenberg, D. and Henner, W.D.: Isolation and analysis of the gene and cDNA for a human mu class glutathione S-transferase, GSTM4. *J Biol Chem* 268 (1993), S. 16958-16965.
- Cribb A.E., Grant, D.M., Miller, M.A and Spielberg, S.P.: Expression of monomorphic arylamine *N*-acetyltransferase (NAT1) in human leukocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 259 (1991), S. 1241-1246.
- Cribb, A.E., Nakamura, H, Grant, D.M., Miller, M.A. and Spielberg, S.P.: Role of polymorphic and monomorphic human arylamine *N*-acetyltransferases in determining sulfamethoxazole metabolism. *Biochem Pharmacol* 45 (1993), S. 1277-1282.
- Cribb, A.E., Isbrucker, R., Levatte, T., Tsui, B., Gillespie, C.T. and Renton, K.W.: Acetylator phenotyping: the urinary caffeine metabolite ration in slow acetylators correlates with a marker of systemic NAT1 activity. *Pharmacogenetics* 4 (1994), S. 166-170.
- Cribb, A.E., Tsui, B., Isbrucker, R., Michael, R.T., Gillespie, C.T., Brown-Bonomo, J., Barrett, P., Levatte, T. and Renton, K.W.: Assessment of arylamine *N*-acetyltransferase (NAT1) activity in mononuclear leucocytes of cystic fibrosis patients. *Br J Clin Pharmacol* 39 (1995), S. 85-89.
- Culp, S.J., Roberts, D.W., Talaska, G.M, Lang, N.P., Fu, P.P., Lay, J.O. Jr., Teitel, C.H., Snawder, J.E., von Tungeln, L.S. and Kadlubar, F.F.: Immunochemical, 32P-postlabeling, and GC/MS detection of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in human peripheral lung in relation to metabolic activation pathways involving pulmonary *N*-oxidation, conjugation, and peroxidation. *Mutat Res* 378 (1997), S. 97-112.
- De Bruin, W.C., Wagenmans, M.J., Board, P.G. and Peters, W.H.: Expression of glutathione S-transferase theta class isoenzymes in human colorectal and gastric cancers. *Carcinogenesis* 20 (1999), S. 1453-1457.
- Deitz, A.C., Doll, M.A. and Hein, D.W.: A restriction DNA-Abschnitt length polymorphism that differentiates human *N*-acetyltransferase 1 (NAT1) alleles. *Anal Biochem* 253 (1997), S. 219-224.
- Deitz, A.C., Doll, M.A., Fretland, A.J. and Hein, D.W.: Homo sapiens *N*-acetyltransferase NAT1 (allele NAT1*18A) gene, complete cds. Genbank AF032677, 1997.
- Deitz, A.C., Doll, M.A., Fretland, A.J. and Hein, D.W.: Homo sapiens *N*-acetyltransferase NAT1 (allele NAT1*18B) gene, complete cds. Genbank AF032678, 1997.
- Deitz, A.C., Fretland, A.J., Leff, M.A. and Hein, D.W.: Homo sapiens *N*-acetyltransferase NAT1 (allele NAT1*26A) gene, complete cds. Genbank AF071552, 1998.

- Deitz, A.C., Fretland, A.J., Leff, M.A. and Hein, D.W.: Homo sapiens *N*-acetyltransferase NAT1 (allele NAT1*26B) gene, complete cds. Genbank AF067408, 1998.
- DeJong, J.L., Chang, C.M., Whang Peng, J., Knutsen, T. and Tu, C.P.: The human liver glutathione *S*-transferase gene superfamily: expression and chromosome mapping of an Hb subunit cDNA. *Nucleic Acids Res* 16 (1988a), S. 8541-8554.
- DeJong, J.L., Morgenstern, R., Jörnvall, H., Depierre, J.W. and Tu, C.P.: Gene expression of rat and human microsomal glutathione *S*-transferases. *J Biol Chem* 263 (1988b), S. 8430-8436.
- Del Boccio, G., Di Ilio, C. Alin, P., Jorvall, H. and Mannervik, B.: Identification of a novel glutathione transferase in human skin homologous with class alpha glutathione transferase 2-2 in the rat. *Biochem J* 244 (1987), S. 21-25.
- Deloménie, C., Goodfellow, G.H., Krishnamoorthy, R., Grant, D.M. and Dupret, J.-M.: Study of the role of the highly conserved residues Arg9 and Arg64 in the catalytic function of human *N*-acetyltransferases NAT1 and NAT2 by site-directed mutagenesis. *Biochem J* 323 (1997), S. 207-215.
- Derewlany, L.O., Knie, B. and Koren, G.: Human placental transfer and metabolism of *p*-aminobenzoic acid. *J Pharmacol Exp Therap* 269 (1994), S.761-765.
- Derewlany, L.O., Knie, B. and Koren, G.: Arylamine *N*-acetyltransferase activity of human placenta. *J Pharmacol Exp Ther* 269 (1994), S. 756-760.
- Dirven, H.A., van Ommen, B. and van Bladeren, P.J.: Involvement of human glutathione *S*-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione. *Cancer Res* 54 (1994), S. 6215-6220.
- Dirven, H.A., Megens, L., Oudshoorn, M.J., Dingemanse, M.A., van Ommen, B. and van Bladeren, P.J.: Glutathione conjugation of the cytostatic drug ifosfamide and the role of human glutathione *S*-transferases. *Chem Res Toxicol* 8 (1995a), S. 979-986.
- Dirven, H.A., Dictus, E.L., Broeders, N.L., van Ommen, B. and van Bladeren, P.J.: The role of glutathione *S*-transferase isoenzymes in the formation of glutathione conjugates of the alkylating cytostatic drug thiotepa. *Cancer Res* 55 (1995b), S. 1701-1706.
- Doll, M.A., Rustan, T.D., Gray, K., Feng, Y., Ferguson, R. and Grant, D.M.: Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis* 14 (1993), S. 1633-1638.
- Doll, M.A. and Hein, D.W.: Cloning, sequencing and expression of NAT1 and NAT2 encoding genes from rapid and slow acetylator inbred rats. *Pharmacogenetics* 5 (1995), S. 247-251.

- Doll, M.A., Jiang, W., Deitz, A.C., Rustan, T.D. and Hein, D.W.: Identification of a novel allele at the human NAT1 acetyltransferase locus. *Biochem Biophys Res Commun* 233 (1997), S. 584-591.
- Dupret, J.-M., Goodfellow, G.H., Janezic, S.A. and Grant, D.M.: Structure-function studies of human arylamine N-acetyltransferases NAT1 and NAT2. *J Biol Chem* 269 (43) (1994), S. 26830-26835.
- Elexpuru-Camiruaga, J., Buxton, N., Kandula, V., Dias, P.S., Campbell, D., McIntosh, J., Broome, J., Jones, P., Inskip, A., Aldersa, J., Fryer, A.A. and Strange, R.C.: Susceptibility to astrocytoma and meningioma: influence of allelism at glutathione S-transferase (GSTT1 and GSTM1) and cytochrome P-450 (CYP2D6) loci. *Cancer Res* 55 (1995), S. 4237-4239.
- Egyhazi, S., Edgren, M.R., Hansson, J., Krockel, D., Mannervik, B. and Ringborg, U.: Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, glutathione transferase M3-3 and glutathione in resistance to carmustine in a human non-small cell lung cancer cell line. *Eur J Cancer* 33 (1997), S. 447-452.
- Endicott, J.A. and Ling, V.: The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug-resistance. *Annu Rev Biochem* 58 (1989), S. 137-171.
- Evans, D.A.P.: N-Acetyltransferase. In: Kalow, W.: *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, Pergamon Press, New York (1992), S. 95-178.
- Ferguson, R.J., Doll, M.A., Rustan, T.D., Baumstark B.R. and Hein, D.W.: Syrian hamster monomorphic N-acetyltransferase (NAT1) alleles: amplification, cloning, sequencing, and expression in *E. coli*. *Pharmacogenetics* 4 (1994), S. 82-90.
- Ford, E.B.: *Ecological Genetics*. 3rd edition, Chapman & Hall, London, 1971.
- Fukutome, K., Watanabe, M., Shiraishi, T., Murata, M., Uemura, H., Kubota, Y., Kawamura, J., Ito, H. and Yatani, R.: N-acetyltransferase 1 genetic polymorphism influences the risk of prostate cancer development. *Cancer Lett* 136 (1999), S. 83-87.
- Garnier, R., Rambourg-Schepens, M.O., Müller, A. and Hallier, E.: Glutathione transferase activity and formation of macromolecular adducts in two cases of acute methyl bromide poisoning. *Occup Environ Med* 53 (1996), S. 211-215.
- Georgiou, I., Filiadis, I.F., Alamanos, Y., Bouba, I., Giannakopoulos, X. and Lolis, D.: Glutathione S-transferase null genotypes in transitional cell bladder cancer. *Europ Urol* 37 (2000), S. 660-664.
- Gertig, D.M., Stampfer, M., Haimann, C., Hennekens, Ch., Kelsey, K. and Hunter, D.J.: Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7 (1998), S. 1001-1005.

- Gisi, D., Leisinger, T. and Vuilleumier, S.: Enzyme mediated dichloromethane toxicity and mutagenicity of bacterial and mammalian dichloromethane-active glutathione S-transferases. *Arch Toxicol* 73 (2) (1999), S. 71-79.
- Glowinski, I.B., Radtke, H.E. and Weber, W.W.: Genetic variation in *N*-acetylation of carcinogenic arylamines by human and rabbit liver. *Mol Pharmacol* 14 (1978), S. 940-949.
- Goodfellow, G.H., Dupret, J.-M. and Grant, D.: Identification of amino acids imparting acceptor substrate selectivity to human arylamine acetyltransferases NAT1 and NAT2. *Biochem J* 348 (2000), S. 159-166.
- Gottesman, M.M. and Pastan, I.: The multidrug transporter, a double-edged sword. *J Biol Chem* 263 (1988), S. 12163-12166.
- Grant, D.M., Blum, M., Beer, M. and Meyer U.A.: Monomorphic and polymorphic human arylamine *N*-acetyltrasferases: a comparison of liver enzymes and expressed products of two cloned genes. *Mol Pharmacol* 39 (1991), S. 184-191.
- Grant, D.M.: Molecular genetics of the *N*-acetyltransferases. *Pharmacogenetics* 3 (1993), S. 45-50.
- Grant, D.M., Hughes, N.C., Janezic, S.A., Goodfellow, G.H., Chen, H.L., Gaedigk, A., Yu, V.L. and Grewal, R.: Human acetyltransferase polymorphism. *Mutat Res* 376 (1997), S. 61-70.
- Graves, R.J., Coutts, C., Eytton-Jones, H. and Green, T.: Relationship between hepatic DNA damage and methylene chloride-induced hepatocarcinogenicity in B6C3F1 mice. *Carcinogenesis* 15(5) (1994), S. 991-996.
- Green, V.J., Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., Knapp, M.J. and Park, B.K.: Glutathione S-transferase μ genotype (*GSTM1*0*) in Alzheimer's patients with tacrine transaminitis. *Br J Clin Pharmacol* 39 (1995), S. 411-415.
- Grömping, A. and Cammann, K.: Some new aspects of a HPLC-method for the determination of traces of formaldehyde in air. *Fresenius Z Anal Chem* 335 (1989), S. 796-801.
- Guengrich, F.P., Thier, R., Persmark, M., Taylor, J.B., Pemble, S.E. and Ketterer, B.: Conjugation of carcinogens by Theta class glutathione S-transferases: mechanisms and relevance to variations in human risk. *Pharmacogenetics* 5 (1995), S. 103-107.
- Gupta, V., Jani, J.P., Jacobs, S., Levitt, M., Fields, L., Awasthi, S., Xu, B.H., Sreevardhan, M., Awasthi, Y.C. and Singh, S.V.: Activity of melphalan in combination with the glutathione transferase inhibitor sulfasalazine. *Cancer Chemother Pharmacol* 36 (1995), S. 13-19.
- Habig, W.H. and Jakoby, W.B.: Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in Enzymology* 77 Academic Press Inc. (1981), ISBN 0-12-181977-9.

- Hallier, E., Deutschmann, S., Reichel, C., Bolt, H.M. and Peter, H.: A comparative investigation of the metabolism of methyl bromide and methyl iodide in human erythrocytes. *Int Arch Occup Environ Health* 62 (1990), S. 221-225.
- Hallier, L., Langhof, T., Dannappel, D., Leutbecher, M., Schröder, K., Goergens, H.W., Müller, A. and Bolt, H.M.: Polymorphism of glutathione conjugation of methyl bromide, ethylene oxide and dichloromethane in human blood: influence on the induction of sister chromatide exchanges (SCE) in lymphocytes. *Arch Toxicol* 67 (1993), S. 173-178.
- Hallier, E., Schröder, K.R., Asmuth, K., Dommermuth, A., Aust, B. and Goergens, H.W.: Metabolism of dichloromethane (methylene chloride) to formaldehyde in human erythrocytes: influence of polymorphism of glutathione transferase Theta (GSTT1-1). *Arch Toxicol* 68 (1994), S. 423-427.
- Harris, J., Coles, B., Meyer, D.J. and Ketterer, B.: The isolation and characterization of the major glutathione S-transferase from the squid *Ioligo vulgaris*. *Biochem Physiol* 98B (1991), S. 511-515.
- Hartmann, C.: Increasing precision by replicate measurements. *Analysis Magazine* 22 (1994), M19.
- Hayes, J.D., Kerr, L.A. and Cronshaw, A.D.: Evidence that glutathione S-transferases B1B1 and B2B2 are the products of separate genes and that their expression in human liver is subject to inter-individual variation. Molecular relationship between the B1 and B2 subunits and other Alpha class glutathione S-transferases. *Biochem J* 264 (1989), S. 437-445.
- Hein, DW, Rustan, TD, Bucher, KD, Martin, W.J. and Furman, E.J.: Acetylator phenotype-dependent and -independent expression of arylamine *N*-acetyltransferase isoenzymes in rapid and slow acetylator inbred rat liver. *Drug Metab Disp* 19 (1991), S. 933-937.
- Hein, D.W., Doll, M.A., Rustan, T.D., Gray, K., Feng, Y., Ferguson, R.J. and Grant, D.M.: Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis* 14(8) (1993), S. 1633-1638.
- Hein, D.W., Rustan, T.D., Ferguson, R.J., Doll, M.A. and Gray, K.: Metabolic activation of aromatic and heterocyclic *N*-hydroxyarylamines by wild-type and mutant recombinant human NAT1 and NAT2 acetyltransferases. *Arch Toxicol* 68 (1994), S. 129-133.
- Hein, D.W., Grant, D.M. and Sim, E.: Update on consensus arylamine *N*-acetyltransferase gene nomenclature. *Pharmacogenetics* 10 (2000), S. 291-292.
- Hengstler, J.G., Arand, M., Herrero, M.E. and Oesch, F.: Polymorphisms of *N*-Acetyltransferases, Glutathione S-Transferases, Microsomal Epoxide Hydrolase and Sulfotransferases: Influence on Cancer Susceptibility. *Rec Res Cancer Res* 154 (1998), S. 47-85.
- Hennig, W. *Genetik*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg (1995), ISBN 3-540-56075-0.

- Henning, S., Cascorbi, I., Münchow, B., Jahnke, V. and Roots, I.: Association of arylamine *N*-acetyltransferases NAT1 and NAT2 genotypes to laryngeal cancer risk. *Pharmacogenetics* 9 (1999), S. 103-111.
- Hickmann, D., Risch, A., Buckle, V., Spurr, N.K., Jeremiah S.J., McCarthy, A. and Sim, E.: Chromosomal localization of human genes for arylamine *N*-acetyltransferase. *Biochemical J* 297 (1994), S. 441-445.
- Hickmann, D., Pope, J., Patil, S.D., Fakis, G., Smelt, V., Stanley, L.A., Payton, M., Unakat, J.D. and Sim, E.: Expression of arylamine *N*-acetyltransferase in human intestine. *Gut* 42 (1998), S. 402-409.
- Hirvonen, A., Saarikoski, S.T., Linnainmaa, K., Koskinen, K., Husgafvel-Pursiainen, K., Mattson, K. and Vainio, H.: Glutathione *S*-transferase and *N*-acetyltransferase genotypes and asbestos-associated pulmonary disorders. *J Natl Cancer Inst* 88 (24) (1996), S. 1853-1856.
- Homma, H. and Liatowsky, J.: Identification of Yb-glutathione-*S*-transferase as a major rat liver protein labelled with dexamethason-21-methansulfonat. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 (1985), S. 7165-7169.
- Hubbard, A.L., Moyes, C., Wyllie, A.H., Smith, C.A. and Harrison, D.J.: *N*-acetyltransferase 1: two polymorphisms in coding sequence identified in colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 77 (1998), S. 913-916.
- Hughes, H.B., Schnidt, L.H. and Biehl, J.P.: The metabolism of isoniazid, its implications in therapeutic use. *Trans 14th Conf Chemother Tuberc*, Washington D.C. (1955), S. 217-222.
- Hughes, N.C., Janezic, S.A., McQueen, K.L., Jewett, M.A.S., Castranio, T., Bell, D.A. and Grant, D.M.: Identification and characterization of variant alleles of human acetyltransferase NAT1 with defective function using *p*-aminosalicylate as an in-vivo and in-vitro probe. *Pharmacogenetics* 8 (1998), S. 55-66.
- Hussey, A.J. and Hayes, J.D.: Characterization of a human class-Theta glutathione *S*-transferase with activity towards 1-menaphtyl sulphate. *Biochem J* 286 (1992), S. 929-935.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. Dichloromethane. *IARC Monogr* 41 (1986), S. 43-85.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1-42. *IARC Monogr Suppl* 7 (1987).

- Ishikawa, T. and Akimaru, K.: Transport of glutathione S-conjugates from cancer cells: function and structure of the GS-X pump. Hrsg.: Vermeulen N.P.E., Mulder, G.J., Nieuwenhuys, H., Peters, W.H.M. and van Bladeren, P.J.. Taylor and Francis Ltd., London (1996), S.199-211.
- Jacoby, W.B.: The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol* 46 (1978), S. 383-414.
- Jakobsson, P.-J., Mancini, J.A. and Ford-Hutchinson, A. W.: Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C4 synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenase activating protein and leukotriene C4 synthase. *J Appl Physiol* 271 (1996), S. 22203-22210.
- Jakobsson, P.-J., Mancini, J.A., Riendeau, D. and Ford-Hutchinson, A. W.: Identification and characterization of a novel microsomal enzyme with glutathione-dependent transferase and peroxidase activities. *Life Med Sci* 272 (1997), S. 22934-22939.
- Jenne, J.W.: Partial purification and properties of the isoniazid transacetylase in human liver. Its relationship to the acetylation of *p*-aminosalicylic acid. *J Clin Invest* 44 (1965), S. 1992-2002.
- Jensson, H., Guthenberg, C., Alin, P., Mannervik, B.: Rat glutathione transferase 8-8, an enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxy-alk-2-enals. *FEBS Lett* 203 (1986), S. 207-209.
- Johnson, N. and Sim, E.: Homo sapiens N-acetyltransferase type 1 (NAT1) gene, allele NAT1*11B, complete cds Genbank AJ278017, 2000.
- Jourenkova-Mironova, N., Wikman, H., Bouchardy, C., Mitrunen, K., Dayer, P., Benhamou, S. and Hirvonen, A.: Role of arylamine N-acetyltransferase 1 and 2 (NAT1 and NAT2) genotypes in susceptibility to oral/pharyngeal and laryngeal cancers. *Pharmacogenetics* 9 (1999), S. 533-537.
- Juronen, E., Tasa, G., Uuskula, M., Pooga, M. and Mikelsaar, A.V.: Purification, characterization and tissue distribution of human class theta glutathione S-transferase T1-1. *Biochem Mol Biol Int* 39 (1996), S. 21-29.
- Kano, T., Inatomi, H., Nagaoka, A. and Sugita, A.: Structure and expression of a human class pi glutathione S-transferase messenger RNA. *Cancer Res* 47 (1987), S. 5626-5630.
- Karnes, H.T., Riley, C.M., Curry, S.H. and Schulmann, S.G.: Analysis of *N*-benzoyl-*L*-tyrosyl-*p*-aminobenzoic acid (bentiromide) metabolites in urine by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 338 (1985), S. 377-388.

- Kato, T., Kaneko, S., Boissy, R., Watson, M., Ikemura, K. and Bell, D.A.: A pilot study testing the association between *N*-acetyltransferase 1 and 2 and risk of oral squamous cell carcinoma in Japanese people. *Carcinogenesis* 19 (1998), S. 1803-1807.
- Kato, T., Boissy, R., Nagata, N., Kitagawa, K., Kuroda, Y., Itoh, H., Kawamoto, T. and Bell, D.A.: Inherited polymorphism in the *N*-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) genes and susceptibility to gastric and colorectal cancers. *Int J Cancer* 85 (2000), S. 46-49.
- Kawakubo, Y. and Ohkido, M.: Epidermal *N*-acetylation of *p*-aminobenzoyl glutamic acid: difference in response to ultraviolet B irradiation. *J Dermatol Sci* 16 (1998), S. 99-103.
- Kawakubo, Y., Merk, H.F., Al Masaoudi, T., Sieben, S. and Blömeke, B.: *N*-acetylation of paraphenylenediamine in human skin and keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 292 (2000), S. 150-155.
- Kelsey, K.T., Wiencke, J.K., Ward, J., Bechtold, W. and Fajen, J.: Sister-chromatid exchanges, glutathione *S*-transferase theta deletion and cytogenic sensitivity to diepoxybutane in lymphocytes from butadiene monomer production workers. *Mutat Res* 335 (3) (1995), S. 267-273.
- Kelsey, K.T., Spitz, M.R., Zuo, Z.F. and Wiencke, J.K.: Polymorphisms in the glutathione *S*-transferase class mu and theta genes interact and increase susceptibility to lung cancer in minority populations (Texas, United States). *Cancer Causes Control* 4 (1997a), S. 554-559.
- Kelsey, K.T., Nelson, H.H., Wiencke, J.K., Smith, C.M. and Levin, S.: The glutathione *S*-transferase theta and mu deletion polymorphisms in asbestosis. *Am J Ind Med* 31 (3) (1997b), S. 274-279.
- Kempkes, M., Wiebel, F.A., Golka, K., Heitmann, P. and Bolt, H.M.: Comparative genotyping and phenotyping of glutathione *S*-transferase GSTT1. *Arch Toxicol* 70 (1996), S. 306-309.
- Kempkes, M., Golka, K., Reich, S., Reckwitz, T. and Bolt, H.M.: Glutathione *S*-transferase GSTM1 and GSTT1 null genotypes as potential risk factors for urothelial cancer of the bladder. *Arch Toxicol* 71 (1996), S. 123-126.
- Kerb, R. Molekulargenetische Untersuchungen zu Polymorphismen von Glutathion *S*-Transferasen aus den Klassen Mu und Theta. Dissertation 1997, Institut für Klinische Pharmakologie der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Kerb, R., Brockmöller, J., Reum, Th. and Roots, I.: Deficiency of glutathione *S*-transferases T1 and M1 as heritable factors of increased cutaneous UV sensitivity. *J Invest Dermatol* 108(2) (1997), S. 229-232.

- Kerdar, R.S., Fasshauer, I., Probst, M. Blum, M., Meyer, U.A. and Wild, D.: 32P-postlabelling studies on the DNA adducts of the food mutagens/carcinogens IQ and PhIP- adduct formation in a chemical system, and by rat and human metabolism. IARC Sci Publ 124 (1993), S. 173-179.
- Ketterer, B. and Meyer, D.J.: Glutathione transferases: a possible role in the detoxication and repair of DNA and lipid hydroperoxides. Mutat Res 214 (1989), S. 33-40.
- Ketterer, B. and Taylor, J.B.: Glutathione Transferases. Hrsg. Ruckpaul/Rein. Frontiers in Biotransformation Vol. 2 (1990), Akademie-Verlag. S. 244-274.
- Kilbane, A.J., Petroff, T. and Weber, W.W.: Kinetics of acetylCoA:arylamine *N*-acetyltransferase from rapid and slow acetylator human liver. Drug Metab Disp 19 (1991), S. 503-507.
- Kim, C., Manning, R.O., Brown, R.P. and Bruckner, J.V.: Use of the vial equilibration technique for determination of metabolic rate constants for dichloromethane. Toxicol Appl Pharmacol 139 (1996), S. 243-251.
- Kim, W.-J., Lee, H.-L., Lee, S.-C., Yong, T.K. and Kim, H.: Polymorphisms of *N*-acetyltransferase 2, glutathione *S*-transferase mu and theta genes as risk factors of bladder cancer in relation to asthma and tuberculosis. J Urol 164 (2000), S. 209-213.
- Kloth, M.T., Gee, R.L., Messing, E.M. and Swaminathan, S.: Expression of *N*-acetyltransferase (NAT1) in cultured human uroepithelial cells. Carcinogenesis 15 (1994), S. 2781-2787.
- Kromidas, S., Klinkner, R. und Mertens, R.: Methodvalidierung im analytischen Labor. Nachr Chem Tech Lab 43 (1995), S. 669-676.
- Kunze, Th. Phosphono Analogues of glutathione as new inhibitors of glutathione *S*-transferase. Arch Pharm Med Chem 329 (1996), S. 503-509.
- Kuzelova, M.A. and Vlasak, R. Prakovní Lék 18 (1966), S. 167.
- LaCreta, F.P., Brennan, J.M., Nash, S., Comis, R.L., Tew, K.D. and O'Dwyer, P.J.: Pharmacokinetics and bioavailability study of ethacrynic acid as a modulator of drug resistance in patients with cancer. J Pharmacol Exp Ther 270 (1994), S. 1186-1191.
- Lasch, J.: Enzymkinetik. Gustav Fischer Verlag, Jena (1987).
- Lear, J.T., Smith, A.G., Heagerty, A.H., Bowers, B., Jones, P.W., Gilford, J., Aldresa, J., Strange, R.C. and Fryer, A.A.: Truncal site and detoxifying enzyme polymorphisms significantly reduce time to presentation of further primary cutaneous basal cell carcinoma. Carcinogenesis 18 (1997), S. 1499-1503.

- Lee, E.J.D., Wong, J.Y.Y., Yeoh, P.N. and Gong, N.H.: Glutathione-S-Transferase Theta (GSTT1) genetic polymorphism among Chinese, Malays and Indians in Singapore. *Pharmacogenetics* 5 (1995), S. 332-334.
- de Leon, J.H., Vatsis, K.P. and Weber, W.W.: Catalytic activities of human *N*-acetyltransferase (NAT1) variants expressed in COS-1 cells. *FASEB J* 10 (1996), A456.
- de Leon, J.H., Vatsis, K.P. and Weber, W.W.: Characterization of naturally occurring and recombinant human *N*-acetyltransferase variants encoded by *NAT1**. *Mol Pharmacol* 58 (2000), S. 288-299.
- Li, R., Boerwinkle, E., Olshan, A.F., Chambless, L.E., Pankow, J.S., Tyroler, H.A., Bray, M., Pittman, G.S., Bell, D.A. and Heiss, G.: Glutathione S-transferase genotype as a susceptibility factor in smoking-related coronary heart disease. *Atherosclerosis* 149 (2000), S. 451-462.
- Liese, W. und Autorenkollektiv: Grundlagen der Enzymaktivitätsbestimmungen in der klinischen Chemie. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1988).
- Van Lieshout, E.M.M., Tiemessen, D.M., Roelofs, H.M.J. and Peters, W.H.M.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs enhance glutathione S-transferase theta levels in rat colon. *Biochim Biophys Acta* 1381 (1998a), S. 305-311.
- Van Lieshout, E.M.M., Bedaf, M.M., Pieter, M., Ekkel, C., Nijhoff, W.A. and Peters, W.H.: Effects of dietary anticarcinogens on rat gastrointestinal glutathione S-transferase theta 1-1 levels. *Carcinogenesis* 19 (1998b), S. 2055-2057.
- Lin, H.J., Probst-Hensch, N.M., Hughes, N.C., Sakamoto, G.T., Louie, A.D., Kau, I.H., Lin, B.K., Lee, D.B., Lin, J., Frankl, H.D., Lee, E.R., Hardy, S., Grant, D.M. and Haile, R.W.: Variants of *N*-acetyltransferase NAT1 and a case-control study of colorectal adenomas. *Pharmacogenetics* 8 (1998), S. 269-281.
- Lindsay, R.M., McLaren, A.M. and Baty, J.D.: Reversed-phase high performance liquid chromatographic assay for the determination of the in vitro acetylation of *p*-aminobenzoic acid by human whole blood. *J Chromatogr* 433 (1988), S. 292-297.
- Lineweaver, H. and Burk, D.: The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 56 (1934), S. 658-660.
- Litwack, G., Ketterer, B. and Arias J.M.: Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature* 234 (1971), S. 466-467.
- Liu, Y. and Levy, G.N.: Activation of heterocyclic amines by combinations of prostaglandin H synthase-1 and -2 with *N*-acetyltransferase 1 and 2. *Cancer Lett* 133 (1998), S. 115-123.

- Lo-Guidice, J.-M., Marez, D., Barat, F., Spire, C., Chevalier, D. and Broly, F.: Human *N*-acetyltransferase 1 (NAT1) gene, *NAT1*28* allele. Genbank AF082904, 1999.
- Lo-Guidice, J.-M., Marez, D., Barat, F., Spire, C., Chevalier, D. and Broly, F.: Human *N*-acetyltransferase 1 (*NAT1*) gene, *NAT1*29* allele. Genbank AF082903, 1999.
- Lo-Guidice, J.-M., Allorge, D., Chevalier, D., Debuysère, H., Fazio, F., Lafitte, J.-J. and Broly, F.: Molecular analysis of the *N*-acetyltransferase 1 gene (*NAT1**) using polymerase chain reaction-restriction fragment single strand conformation polymorphism assay. *Pharmacogenetics* 10 (2000), S. 293-300.
- Long, G.L. and Winefordner, J.D.: Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal Chem* 55 (1983), S. 713.
- Madden, S., Woolf, T.F., Pool, W.F. and Park, B.K.: An investigation into the formation of stable, protein-reactive and cytotoxic metabolites from tacrine in vitro. Studies with human and rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 46 (1993), S. 13-20.
- Madden, S., Spaldin, V., Hayes, R.N., Woolf, T.F., Pool, W.F. and Park, B.K.: Species variation in the bioactivation of tacrine by hepatic microsomes. *Xenobiotica* 25 (1995), S. 103-116.
- Mainwaring, G.W., Williams, S.M., Foster, J.R., Tugwood, J. and Green, T.: The distribution of Theta-class glutathione S-transferase in the liver and lung of mouse, rat and human. *Biochem J* 318 (1996), S. 297-303.
- Mannervik, B.: *Methods Enzymol* 87 (1982), S. 370-390.
- Mannervik, B., Awasthi, Y.C., Board, P.G., Hayes, J.D., Di Ilio, C., Ketterer, B., Listowsky, I., Morgenstern, R., Muramatsu, M., Pearson, W.R., Pickett, C.B., Sato, K., Widersten, M. and Wolf, C.R.: Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J* 282 (1992), S. 305-306.
- McLellan, R.A., Oscarson, M., Alexandrie, A.K., Seidegard, J., Evans, D.A., Ranung, A. and Ingelman-Sundberg, M.: Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated *GSTM1* gene that causes ultrarapid enzyme activity. *Mol Pharmacol* 52 (1997), S. 958-965.
- McQueen, C.A and Weber, W.W.: Characterization of human lymphocyte *N*-acetyltransferase and its relationship to the isoniazid acetylation polymorphism. *Biochem Genet* 18 (1980), S. 889-904.
- Meyer, D.J. Significance of an unusually low K_m for glutathione in glutathione transferases of the alpha, mu and pi classes. *Xenobiotica* 23(8) (1993), S. 823-834.

- Meyer, D.J., Coles, B., Pemble, S.E., Gilmore, K.S., Fraser, G.M. and Ketterer, B.: Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J* 274 (1991), S. 409-414.
- Michaelis, L. und Menten, M.L.: Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* 49 (1913), S. 333-369.
- Millikan, R.C., Pittman, G.S., Newman, B., Tse, C.K., Selmin, O., Rockhill, B., Savitz, D., Moorman, P.G. and Bell, D.A.: Cigarette smoking, *N*-acetyltransferase 1 and 2, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7 (5) (1998), S. 371-378.
- Minchin, R.F.: Acetylation of *p*-aminobenzoylglutamate, a folic acid catabolite, by recombinant human arylamine *N*-acetyltransferase and U937 cells. *Biochem J* 307 (1995), S.1-3.
- Mitchell, R.S., Riemensnider, D.K., Harsch, J.R. and Bell, J.C.: New information on the clinical implications of individual variations in the metabolic handling of antituberculous drugs particularly isoniazid. *Trans 17th Conf Chemother Tuberc*, Washington D.C. (1958), S. 77-85.
- Moisio, A.-L., Sistonen, P., Mecklin, J.-P., Järvinen, H. and Peltomäki, P.: Genetic polymorphisms in carcinogen metabolism and their association to hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology* 115 (1998), S. 1387-1394.
- Mosialou, E., Anderson, C., Lundqvist, G., Anderson, G., Bergman, T., Jornvall, H., Morgenstern, R., Athar, M., Mukhtar, H., Bickers, D.R., Khan, I.U. and Kalyanaraman, B.: Human liver microsomal glutathione transferase. Substrate specificity and important protein sites. Evidence for the metabolism of tumor promotor organic hydroperoxides into free radicals by human carcinoma skin keratinocytes: an ESR-spin trapping study. *FEBS Lett* 315 (1993), S. 77-80.
- Müller, M., Kramer, A., Angerer, J. and Hallier, E.: Ethylene oxide-protein adduct formation in humans: influence of glutathione *S*-transferase polymorphisms. *Int Arch Occup Environ Health* 71 (7) (1998), S. 499-502.
- Mulders, T.M., Keizer, H.J., Breimer, D.D. and Mulder, G.J.: In vivo characterization and modulation of the glutathione/glutathione *S*-transferase system in cancer patients. *Drug Metab Rev* 27 (1995), S. 191-229.
- Nash, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem J* 55 (1953), S. 416-421.
- Naud, C., Benoit, G., Simard, M. and Astier, A.: No relationship between tacrine cytotoxicity and its metabolism by cytochrome P4501A2. *Ann Pharm Fr* 55 (1997), S. 254-261.

- Nelson, H.H., Wiencke, J.K., Christiani, D.C., Cheng, T.J., Zuo, Z.-F., Schwartz, B.S., Lee, B.-K., Spitz, M.R., Wang, M., Xu, X. and Kelsey, K.T.: Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 16 (5) (1995), S. 1243-1245.
- Nemoto, N., Gelboin, H.V., Habig, W.H., Ketley, J.N. and Jacoby, W.B.: K region benzo (alpha)pyrene-4,5-oxide is conjugated by homogenous glutathione S-transferases. *Nature* 255 (1975), S. 512.
- Norppa, H., Hirvonen, A., Järventaus, H., Uusküla, M., Tasa, G. Ojajärvi, A. and Sorsa, M.: Role of *GSTT1* and *GSTM1* genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchanges induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis* 16 (6) (1995), S. 1261-1264.
- NTP, National Toxicology Program. Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of dichloromethane in F344/N rats and BF6C3F1 mice (inhalation studies). US Dept of Health and Human Services. NIH publication No. 86-2562, NTP-TR 306, 1986.
- Ohsako, S. and Deguchi, T.: Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine *N*-acetyltransferases from human liver. *J Biol Chem* 265 (1990), S. 4630-4634.
- Okkels, H., Sigsgaard, T., Wolf, H. and Autrup, H.: Arylamine *N*-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) polymorphisms in susceptibility to bladder cancer: the influence of smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6 (1997), S. 225-231.
- Ozols, R.F., Louie, K.G., Plowman, J., Behrens, B.C., Fine R.L., Dykes, D. and Hamilton, T.C.: Enhanced melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer in vitro and in tumor-bearing nude mice by buthionine sulfoxime depletion of glutathione. *Biochem Pharmacol* 36 (1987), S. 147-153.
- Pacifici, G.M., Warholm, M., Guthenberg, C., Mannervik, B. and Rane, A.: Detoxification of styrene oxide by human liver glutathione transferase. *Hum Toxicol* 6 (1987), S. 483-489.
- Palamanda, J.R., Hickmann, D., Ward, A., Sim, E., Romkes-Sparkes, M. and Unadkat, J.D.: Dapsone acetylation by human liver arylamine *N*-acetyltransferases and interaction with opportunistic infection drugs. *Drug Metab Disp* 23 (1995), S. 473-477.
- Pankow, D., Damme, B and Schror, K.: Acetylsalicylic acid – inducer of cytochrome P-450 2E1? *Arch Toxicol* 68 (1994), S. 261-265.
- Payton, M. and Sim, E.: Genotyping human arylamine *N*-acetyltransferase type 1 (NAT1) *Biochem Pharmacol* 55 (1998), S. 361-366.

- Pearson, W.R., Vorachek, W.R., Xu, S.J., Berger, R., Hart, I., Vannais, D. and Patterson, D.: Identification of class mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *Am J Hum Genet* 53 (1993), S. 220-233.
- Pemble, S. and Taylor, J.B.: An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochem J* 287 (1992), S. 957-963.
- Pemble, S., Schröder, K.R., Spencer, Sh. R., Meyer, D.J., Hallier, E., Bolt, H.M., Ketterer, B. and Taylor, J.B.: Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300 (1994), S. 271-276.
- Pemble, S.P., Wardle, A.F. and Taylor, J.B.: Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem J* 319 (1996), S. 749-754.
- Peter, H., Deitschmann, S., Reichel, C. and Hallier, E.: Metabolism of methyl chloride by human erythrocytes. *Arch Toxicol* 63 (1989), S. 351-335.
- Peter, H., Deutschmann, S., Mueller, A., Gansewendt, B., Bolt, M. and Hallier, E.: Different affinity of erythrocyte glutathione-S-transferase to methyl chloride in humans. *Arch Toxicol Suppl.* 13 (1989), S. 128-132.
- Pfau, W., Stone, E.M., Carmichael, P.L., Marquardt, H. and Phillips, D.H.: DNA adducts in human breast tissue: association with *N*-acetyltransferase-2 (NAT2) and NAT1 genotypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7 (11) (1998), S. 1019-1025.
- Pfeifer, S., Pflegel, P. und Borchert, H.H.: Biopharmazie. Ullstein Mosley Verlag, Wiesbaden, 1995.
- Ploemen, J.H.T.M., van Ommen, B., Bogaards, J.J.P. and van Bladeren, P.J.: Ethacrynic acid and its glutathione conjugate as inhibitors of glutathione S-transferases. *Xenobiotica* 23 (8) (1993), S. 913-923.
- Ploemen, J.H.T.M., Wormhoudt, L.W., van Ommen, B., Commandeur, J.N.M., Vermeulen, N.P.E. and van Bladeren, P.J.: Polymorphism in the glutathione conjugation activity of human erythrocytes towards ethylene dibromide and 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propane. *Biochim Biophys Acta* 1243 (1995), S. 469-476.
- Ploemen, J.H.T.M., van Ommen, B., van Iersel, M.L.P.S., Rompelberg, C.J.M., Verhagen, H. and van Bladeren, P.J.: Irreversible inhibition of cytosolic glutathione S-transferases. In: *Glutathione S-transferases. Structure, function and clinical implications.* Hrsg.: Vermeulen N.P.E., Mulder, G.J., Nieuwenhuys, H., Peters, W.H.M. and van Bladeren, P.J.. Taylor and Francis Ltd., London (1996), S. 143-152.
- Poethke, W. , Kupferschmid, W.: *Praktikum der Maßanalyse.* Gustav Fischer Verlag Jena (1979), S. 203-204.

- Pool, W.F., Woolf, T.F., Reily, M.D., Caprathe, B.W., Emmerling, M.R. and Jaen, J.C.: Identification of 3-hydroxylated tacrine metabolite in rat and man: metabolic profiling implications and pharmacology. *J Med Chem* 39 (1996), S. 3014-3018.
- Preudhomme, C., Nisse, C., Hebbar, M., Vanrumbeke, M., Brizard, A., Lai, J.L. and Fenaux, P.: Glutathione S-transferase theta 1 gene defects in myelodysplastic syndromes and their correlation with karyotype and exposure to potential carcinogens. *Leukemia* 11 (1997), S. 1580-1582.
- Probst, M.R., Blum, M., Fasshauer, I., D'Orazio, D., Meyer, U.A. and Wild, D.: The role of the human acetylation polymorphism in the metabolic activation of the food carcinogen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Carcinogenesis* 13 (1992), S. 1713-1717.
- Probst-Hensch, N.M., Haile, R.W., Li, D.S., Sakamoto, G.T., Louie, A.D., Lin, B.K., Frankl, H.D., Lee, E.R. and Lin, H.J.: Lack of association between the polyadenylation polymorphism in the NAT1 (acetyltransferase 1) gene and colorectal adenomas. *Carcinogenesis* 17 (1996), S. 2125-2129.
- Raney, K.D., Meyer, D.J., Ketterer, B., Harris, T.M. and Guengerich, F.P.: Glutathione conjugation of aflatoxin B1 exo- and endo-epoxides by rat and human glutathione S-transferases. *Chem Res Toxicol* 5 (1992), S. 470-478.
- Rhoads, D.M., Zarlengo, R.P. and Tu, C.P.: The basic glutathione S-transferases from human livers are products of separate genes. *Biochem Biophys Res Commun* 145 (1987), S. 474-481.
- Richterich, R. und Colombo, J.P.: *Klinische Chemie. Theorie, Praxis, Interpretation*. S. Karger Verlag, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney (1978).
- Rieder, M.J., Krause, R. and Bird, I.A.: Time-course of toxicity of reactive sulfonamide metabolites. *Toxicology* 95 (1995), S. 141-146.
- Risch, A., Smelt, V., Lsne, D., Stanley, L., van der Slot, W., Ward, A. and Sim, E.: Arylamine *N*-acetyltransferase in erythrocytes of cystic fibrosis patients. *Pharmacol Toxicol* 78 (1996), S. 235-240.
- Roberts-Thomson, I.C., Butler W.J. and Ryan, P.: Meat, metabolic genotypes and risk for colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 8 (3) (1999), S. 207-211.
- Robertson, I.G., Guthenberg, C., Mannervik, B. and Jernstrom, B.: Differences in stereoselectivity and catalytic efficiency of three human glutathione transferases in the conjugation of glutathione with 7 beta, 8 alpha-dihydroxy-9alpha, 10 alpha-oxy-7,8,9,19-tetrahydrobenzo-(a)pyrene. *Cancer Res* 46 (1986), S. 2220-2224.

- Robertson, D.G., Braden, T.K., Urda, E.R., Lalwani, N.D. and de la Iglesia, F.A.: Elucidation of mitochondrial effects by tetrahydroaminoacridine (tacrine) in rat, dog, monkey and human hepatic parenchymal cells. *Arch Toxicol* 72 (1998), S. 362-371.
- Rodriguez, J.W., Kirlin, W.G., Ferguson, R.J., Doll, M.A., Gray, K., Rustan, T.D., Lee, M.E., Kemp, K., Urso, P and Hein, D.W.: Human acetylator genotype: relationship to colorectal cancer incidence and arylamine *N*-acetyltransferase expression in colon cytosol. *Arch Toxicol* 67 (7) (1993), S. 445-452.
- Roots, I., Drakoulis, N. and Brockmöller, J.: Polymorphic enzymes and cancer risk: concepts, methodology and data review. *Pharmacogenetics of Drug metabolism*. Pergamon Press Inc. (1992), S. 815-841.
- Ross, V.L., Board, P.G. and Webb, G.C.: Chromosomal mapping of the human Mu class glutathione *S*-transferase to 1p13. *Genomics* 18 (1993), S. 87-93.
- Sadrieh, N., Davis, C.D. and Snyderwine, E.G.: *N*-acetyltransferase expression and metabolic activation of the food-derived heterocyclic amines in the human mammary gland. *Cancer Res* 56 (1996), S. 2683-2687.
- Salagovic, J., Kalina, I., Habalova, M., Hrivnak, M., Valansky, L., Kohut, A. and Biros, E.: Genetic polymorphism of glutathione *S*-transferases M1 and T1 as a risk factor in lung and bladder cancers. *Neoplasma* 45 (1998), S. 312-317.
- Sasai, Y., Horiike, S., Misawa, S., Kaneko, H., Kobayashi, M., Fujii, H., Kashima, K. and Taniwaki, M.: Genotype of glutathione *S*-transferase and other genetic configurations in myelodysplasia. *Leuk Res* 23 (1999), S. 975-981.
- Satoh, K.: The high non-enzymatic conjugation rates of some glutathione *S*-transferase (GST) substrates at high glutathione concentrations. *Carcinogenesis* 16 (1995), S. 869-874.
- Scarpato, R., Migliore, L., Hirvonen, A., Falck, G. and Norrpa, H.: Cytogenetic Monitoring of occupational exposure to pesticides: characterization of *GSTM1*, *GSTT1* and *NAT2* genotypes. *Environ Mol Mutagen* 27 (1996), S. 263-269.
- Schröder, K.R., Hallier, E., Meyer, D.J., Wiebel, F.A., Müller, A.M.F. and Bolt, H.M.: Purification and characterization of a new glutathione *S*-transferase, class Theta, from human erythrocytes. *Arch Toxicol* 70 (1996), S. 559-566.
- Schröder, K.R., Hallier, E., Peter, H. and Bolt, H.M.: Dissociation of a new glutathione *S*-transferase activity in human erythrocytes. *Biochem Pharmacol* 43 (8) (1992), S. 1671-1674.

- Schröder, K.R., Wiebel, F.A., Reich, S., Dannappel, D., Bolt, H.M. and Hallier, E.: Glutathione S-transferase (GST) theta polymorphism influences background SCE rate. *Arch Toxicol* 69 (1995), S. 505-507.
- Seidegard, J., Guthenberg, C., Pero, R.W. and Mannervik, B.: The trans-stilbene oxide-active glutathione transferase in human mononuclear leucozytes is identical with the hepatic glutathione transferase mu. *Biochem J* 246 (1987), S. 783-785.
- Shah, V.P., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, J.P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C.T., Cook, C.E., McDowall, R.D., Pittmann, K.A. and Spector, S.: Analytical method validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci* 81 (1992), S. 309 ff.
- Sherratt, P.J., Manson, M.M., Thomson, A.M., Hissind, E.A., Neal, G.E., van Bladeren, P.J., Green, T. and Hayes, J.D.: Increased bioactivation of dihaloalkanes in rat liver due to induction of class theta glutathione S-transferase T1-1. *Biochem J* 335 (1998), S. 619-630.
- Simon, T., Becquemont, L., Mary-Krause, M., de Waziers, I., Beaune, P., Funck-Brentano, C. and Jaillon, P.: Combined glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and tacrine hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* 67 (2000), S. 432-437.
- Sinclair, J. and Sim, E.: A fragment consisting of the first 204 amino-terminal amino acids of human arylamine *N*-acetyltransferase one (NAT1) and the first transacetylation step of catalysis. *Biochem Pharmacol* 53 (1997), S. 11-16.
- Singh, S.V., Creadon, G., Das, M., Mukhtar, H. and Awasthi, Y.C.: Glutathione S-transferases of mouse lung. Selective binding of benzo[a]pyrene metabolites by the subunits which are preferentially induced by t-butylated hydroxyanisole. *Biochem J* 243 (1987), S. 351-358.
- Singhal, S.S., Saxena, M., Ahmad, H., Awasthi, S., Haque, A.K. and Awasthi, Y.C.: Glutathione S-transferases of human lung: characterization and evaluation of the protective role of the alpha-class isoenzymes against lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 299 (1992), S. 232-241.
- Singhal, S.S., Zimniak, P., Sharma, R., Srivastava, S.K., Awasthi, S. and Awasthi, Y.C.: A novel glutathione S-transferase isoenzyme similar to GST8-8 of rat and mGSTA4-4 (GST5.7) of mouse is selectively expressed in human tissues. *Biochim Biophys Acta* 1204 (1994), S. 279-286.
- Smelt, V.A., Mardon, H.J. and Sim, E.: Placental expression of arylamine *N*-acetyltransferases: evidence for linkage disequilibrium between *NAT1*10* and *NAT2*4* alleles of the two human arylamine *N*-acetyltransferase loci *NAT1* and *NAT2*. *Pharmacol Toxicol* 83 (4) (1998), S. 149-157.

- Smelt, V.A., Upton, A., Adjaye, J., Payton, M.A., Johnson, N., Boukouvala, S., Mardon, H.J. and Sim, E.: Expression of arylamine N-acetyltransferase in preterm placentas and in human preimplantation embryos. *Hum Mol Gen* 9 (2000), S. 1101-1107.
- Söderström, M., Mannervik, B., Orning, L. and Hammarström, S.: Leukotriene C4 formation catalyzed by three distinct forms of human cytosolic glutathione transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 128 (1985), S. 265-270.
- Sorsa, M., Osterman-Golkar, S., Peltonen, K., Saarikoski, S.T. and Sram, R.: Assessment of exposure to butadiene in process industry. *Toxicology* 113 (1996), S. 77-83.
- Spielberg, S.P.: *N*-Acetyltransferases: Pharmacogenetics and clinical consequences of polymorphic drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* 24 (5) (1996), S. 509-519.
- Sprenger, R., Schlagenhauser, R., Kerb, R., Brockmüller, J., Bruhn, C. Roots, I. and Brinkmann, U.: Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics* 10 (2000), S. 557-565.
- Stanley, J.S. and Benson, A.M.: The conjugation of 4-nitroquinoline 1-oxide, a potent carcinogen, by mammalian glutathione transferases. 4-Nitroquinoline 1-oxide conjugation by human, rat and mouse liver cytosols, extrahepatic organs of mice and purified mouse GST isoenzymes. *Biochem J* 256 (1988), S. 303-306.
- Stern, S.J., Degawa, M., Martin, M.V., Guengerich, F.P., Kaderlik, R.K., Ilett, K.F., Breau, R., McGhee, M., Montague, D., Lyn-Cook, B. et al.: Metabolic activation, DNA-adducts, and H-ras mutations in human neoplastic and non-neoplastic laryngeal tissue. *J Cell Biochem Suppl* 17F (1993), S. 129-137.
- Stevens, G.J., Payton, M., Sim, E. and McQueen, C.A.: *N*-Acetylation of the heterocyclic amine Batracylin by human liver. *Drug Metab Disp* 27 (9) (1999), S. 966-971.
- Stockmann, P.K., McLellan, L.I. and Hayes, J.D.: Characterization of the basic glutathione S-transferase B1 and B2 subunits from human liver. *Biochem J* 244 (1987), S. 55-61.
- Strange, R.C. and Fryer, A.A.: The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. IARC Scientific Publications, No. 148 (1999), Chapter 19, S. 231-249.
- Stroombergen, M.C. and Waring, R.H.: Determination of glutathione S-transferase mu and theta polymorphisms in neurological disease. *Hum Exp Toxicol* 18 (1999), S. 141-145.
- Suelter, C.H.: Experimentelle Enzymologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1990).
- Suzuki, T., Coggan, M., Shaw, D.C. and Board, P.G.: Electrophoretic and immunological analysis of human glutathione S-transferase isoenzymes. *Ann Hum Genet* 51 (1987), S. 95-106.

- Suzuki, T., Johnston, P.N. and Board, P.G.: Structure and organization of the human alpha class glutathione S-transferase genes and related pseudogenes. *Genomics* 18 (1993), S. 680-686.
- Takahashi, Y., Campbell, E.A., Hirata, Y., Takayama, T. and Listowsky, I.: A basis for differentiating among the multiple human Mu-glutathione S-transferases and molecular cloning of brain GSTM5. *J Biol Chem* 268 (1993), S. 8893-8898.
- Tan, K.-L. and Board, P.G.: Purification and characterization of a recombinant human Theta-class glutathione transferase (GSTT2-2). *Biochem J* 315 (1996), S. 727-732.
- Tan, K.-L., Chelvanayagam, G., Parker, M.W. and Board, Ph.G.: Mutagenesis of the active site of the human Theta class glutathione transferase GSTT2-2: catalysis with different substrates involves different residues. *Biochem J* 31 (1996), S.315-321.
- Tan, K.L., Webb, G.C., Baker, R.T. and Board, P.G.: Molecular cloning of a cDNA and chromosomal localization of a human theta-class glutathione S-transferase gene (GSTT2) to chromosome 22. *Genomics* 25 (1995), S. 381-387.
- Tew, K.D., Bomber, A.M. and Hoffman, S.J.: Ethacrynic acid and piroprost as enhancers of cytotoxicity in drug resistant and sensitive cell lines. *Cancer Res* 48 (1988), S. 3622-3625.
- Tew, K.D.: Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 54 (1994), S. 4313-4320.
- Thier, R., Foest, U., Deutschmann, S., Schröder, K.R., Westphal, G., Hallier, E. and Peter, H.: Distribution of methylene chloride in human blood. *Arch Toxicol Suppl.* 14 (1991), S. 254-258.
- Thier, R., Pemble, S.E., Kramer, H., Taylor, J.B., Guengerich, F.P. and Ketterer, B.: Human glutathione S-transferase T1-1 enhances mutagenicity of 1,2-dibromomethane, dibromomethane and 1,2,3,4-diepoxybutane in *Salmonella typhimurium*. *Carcinogenesis* 17 (1996), S. 163-166.
- Thier, R., Wiebel, F.A. and Bolt, H.: Differential substrate behaviours of ethylene and propylene oxide towards human glutathione transferase theta hGSTT1-1. *Arch Toxikol* 73 (1999a), S. 489-492.
- Thier, R., Lewalter, J., Kempkes, M., Selinski, S., Brüning, T. and Bolt, H.M.: Haemoglobin adducts of acrylonitrile and ethylene oxide in acrylonitrile workers, dependent on polymorphisms of the glutathione transferases GSTT1 and GSTM1. *Arch Toxikol* 73 (1999b), S. 197-202.

- Thompson, P.A., Seyedi, F., Lang, N.P., MacLeod, S.L., Wogan, G.N., Anderson, K.E., Tang, Y.-M., Coles, B and Kadlubar, F.F.: Comparison of DNA adduct levels associated with exogenous and endogenous exposures in human pancreas in relation to metabolic genotype. *Mutat Res* 424 (1999), S. 263-274.
- Totsuka, Y., Fukutome, K., Takahashi, M., Takahashi, S., Tada, A., Sugimura, T and Wakabayashi, K.: Presence of N2-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3,8-dimethylimidazo(4,5-f)quinoxaline (dG-C8-MeIQx) in human tissues. *Carcinogenesis* 17 (1996), S. 1029-1034.
- Trepanier, L.A., Ray, K., Winand, N., Spielberg, S.P. and Cribb, A.E.: Cytosolic arylamine *N*-acetyltransferase (NAT) deficiency in the dog and other canids due to an absence of NAT genes. *Biochem Pharmacol* 54 (1997), S. 73-80.
- Trepanier, L.A., Cribb, A.E., Spielberg, S.P. and Ray, K.: Deficiency of cytosolic arylamine *N*-acetylation in the domestic cat and wild felids caused by the presence of a single *NAT*-like gene. *Pharmacogenetics* 8 (1998), S. 169-179.
- Tsuchida, S., Maki, T. and Sato, K.: Purification and characterization of glutathione transferases with an activity toward nitroglycerin from human aorta and heart. Multiplicity of the human class Mu forms. *J Biol Chem* 265 (1990), S. 7150-7157.
- Tu, C.P. and Qian, B.: Nucleotide sequence of the human liver glutathione *S*-transferase subunit 1 cDNA. *Biochem Soc Trans* 15 (1987), S. 734-736.
- Vatsis, K.P. and Weber, W.W.: Structural heterogeneity of Caucasian *N*-acetyltransferase at the *NAT1* gene locus. *Arch Biochem Biophys* 301 (1993), S. 71-76.
- Vatsis, K.P., Martell, K.J. and Weber, W.W.: Diverse point mutations in the human gene for polymorphic *N*-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991), S. 6333-6337.
- Vatsis, K.P., Weber, W.W., Bell, D.A., Dupret, J.-M., Evans, D.A.P., Grant, D.M., Hein, D.W., Lin, H.J., Meyer, U.A., Relling, M.V., Sim, E., Suzuki, T. and Yamazoe, Y.: Nomenclature for *N*-acetyltransferases. *Pharmacogenetics* 5 (1995), S. 1-17.
- Vorachek, W.R., Pearson, W.R. and Rule, G.S.: Cloning, expression, and characterization of a class-mu glutathione transferase from human muscle, the product of the *GST4* locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991), S. 4443-4447.
- Wagstaff, A.J. and McTavish, D.: Tacrine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease. *Drugs and Aging* 4 (6) (1994), S. 510-540.
- Wang, C.I., Debiec-Rychter, M., Schut, H.A.J., Morse, P., Jones, R.F., Archer, C., King, C.M. and Haas, G.: *N*-Acetyltransferase expression and DNA binding of *N*-hydroxyheterocyclic amines in human prostate epithelium. *Carcinogenesis* 20 (1999), S. 1591-1595.

- Ward, A., Hickman, D., Gordon, J.W. and Sim, E.: Arylamine *N*-acetyltransferase in human red blood cells. *Biochem Pharmacol* 44 (1992), S. 1099-1104.
- Ward, A., Summers, M.J. and Sim, E.: Purification of recombinant human *N*-acetyltransferase type 1 (NAT1) expressed in *E. coli* and characterization of its potential role in folate metabolism. *Biochem Pharmacol* 49 (1995), S. 1759-1767.
- Warholm, M., Guthenberg, C. and Mannervik, B.: Molecular and catalytic properties of glutathione transferase mu from human liver: an enzyme efficiently conjugating epoxides. *Biochemistry* 22 (1983), S.3610-3617.
- Warholm, M., Alexandrie, A.-K., Högberg, J., Sigvardson, K., and Ranung, A.: Polymorphic distribution of glutathione transferase activity with methyl chloride in human blood. *Pharmacogenetics* 4 (1994), S. 307-311.
- Warholm, M., Rane, A., Alexandrie, A.-K., Monaghan, G. and Ranung, A.: Genotypic and phenotypic determination of polymorphic glutathione transferase T1 in a Swedish population. *Pharmacogenetics* 5 (1995), S. 252-254.
- Warwick, A., Sarhanis, P., Redman, Ch., Pemble, S., Taylor, J.B., Ketterer, B., Jones, P., Alldersa, J., Gilford, J., Yengi, L., Fryer, A. and Strange, R.C.: Theta class glutathione *S*-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cervical neoplasia: interactions with GSTM1, CYP2D6 and smoking. *Carcinogenesis* 15 (12) (1994), S. 2841-2845.
- Watkins, P.B., Zimmermann, H.J., Knapp, M.J., Gracon, S.I., and Lewis, K.W.: Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *J Am Med Assoc* 271 (1994), S. 992-998.
- Waxman, D.J.: Glutathione *S*-transferases: role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy - a review. *Cancer Res* 50 (1990), S. 6449-6454.
- Webb, G., Vaska, V., Coggan, M. and Board, P.: Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1). *Genomics* 33 (1996), S. 121-123.
- Weber, W. and Vatsis, K.P.: Individual variability in *p*-aminobenzoic acid *N*-acetylation by human *N*-acetyltransferase (NAT1) of peripheral blood. *Pharmacogenetics* 3 (1993), S. 209-212.
- Widersten, M., Pearson, W.R., Engstrom, A. and Mannervik, B: Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione transferases mu and psi. *Biochem J* 276 (1991), S. 519-524.
- Wiebel, F.A., Dommermuth, A. and Thier, R.: The hereditary transmission of the glutathione transferase hGSTT1-1 conjugator phenotype in a large family. *Pharmacogenetics* 9 (1999), S. 251-256.

- Wiencke, J.K., Pemble, S., Ketterer, B. and Kelsey, K.T.: Gene deletion of glutathione S-transferase Theta: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4 (1995), S. 253-259.
- Wilce, M.C.J., Board, P.G., Feil, S.C., and Parker, M.W.: Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. *EMBO J* 14 (1995), S. 2133-2143.
- Wilce, M.C.J., Oakley, A.J., Rossjohn, J., Feil, S.C., Bello, M.L., Ricci, G., Board, P.G. and Parker, M.W.: Crystallographic studies of pi- and theta-class glutathione transferases. Hrsg.: Vermeulen N.P.E., Mulder, G.J., Nieuwenhuys, H., Peters, W.H.M. and van Bladeren, P.J.. Taylor and Francis Ltd., London (1996), S. 39-48.
- Windmill, K.F., Gaedigk, A., Hall, P.M., Samarasinghe, H., Grant, D.M. and McManus, M.E.: Localization of *N*-acetyltransferases NAT1 and NAT2 in human tissues. *Toxicol Sci* 54 (2000), S. 19-29.
- Xu, X., Wiencke, J.K., Niu, T., Wang, M., Watanabe, H., Kelsey, K.T. and Christiani, D.C.: Benzene exposure, glutathione S-transferase theta homozygous deletion, and sister chromatid exchanges. *Am J Ind Med* 33 (2) (1998), S. 157-163.
- Yung-Jato, L.L.Y., Durie, P.R. and Soldin, S.J.: Liquid chromatographic measurement of *p*-aminobenzoic acid and its metabolites in serum. *Clin Chem* 34 (11) (1988), S. 2235-2238.
- Zenser, T.V., Lakshmi, V.M., Rustan, T.D., Doll, M.A., Deitz, A.C., Davis, B.B. and Hein, D.W.: Human *N*-acetylation of benzidine: role of NAT1 and NAT2. *Cancer Res* 56 (1996), S. 3941-3947.
- Zhang, H., Ahmadi, A., Arbman, G., Zdzienicka, J., Carstensen, J., Nordenskjöld, B., Soderkvist, P. and Sun, X.F.: Glutathione S-transferase T1 and M1 genotypes in normal mucosa, transitional mucosa and colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 84 (1999), S. 135-138.
- Zhao, B., Lee, E.J.D., Yeoh, P.N. and Gong, N.H.: Detection of mutations and polymorphism of *N*-acetyltransferase 1 gene in Indian, Malay and Chinese populations. *Pharmacogenetics* 8 (1998), S. 299-304.
- Zheng, W., Deitz, A.C., Campbell, D.R., Wen, W.-Q., Cerhan, J.R., Sellers, T.A., Folsom, A.R. and Hein, D.W.: *N*-acetyltransferase 1 genetic polymorphism, cigarette smoking, well-done meat intake, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8 (1999), S. 233-239.
- Zhong, S., Spurr, N.K., Hayes, J.D. and Wolf, C.R.: Deduced amino acid sequence, gene structure and chromosomal location of a novel human class Mu glutathione S-transferase, GSTM4. *Biochem J* 291 (1993), S. 41-50.

Internet-Adressen

Das „Arylamine *N*-Acetyltransferase nomenclature committee“ unter Leitung von D. W. Hein veröffentlicht den aktuellen Stand der Benennung von NAT-Allelen bei prokaryotischen und eukaryotischen Organismen unter der Adresse: <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>.

Im Rahmen des *Human Genom Projects* veröffentlicht das Genomforschungszentrum *The Sanger Centre* die Lokalisation von Genen auf den bisher sequenzierten Chromosomen unter: <http://www.sanger.ac.uk/HGP/>.

Unter der Adresse <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/> finden sich allgemeine Regeln zur Nomenklatur von Genen sowie zahlreiche Verweise auf verwandte Datenbanken.

Die unter Leitung von V.A. McKusick vom *National Center for Biotechnology Information* veröffentlichte Datenbank OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) stellt für humane Gene, so auch GSTT1 und NAT1, in Kurzfassung Daten zur Molekulargenetik, funktionellen und klinischen Relevanz von Allelen mit zahlreichen Literaturverweisen und Verweisen auf andere Datenbanken zusammen: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Das Enzym-Informationssystem BRENDA ist eine unter der Leitung von Prof. Dr. D. Schomburg am Institut für Biochemie der Universität zu Köln bearbeitete Datenbank. Unter der Adresse: <http://www.brenda.uni-koeln.de> erhält man umfassende Angaben zur Nomenklatur, Isolation, Struktur, Stabilität, zu Reaktionen, Substraten und Inhibitoren von ca. 3500 Enzymen.

Kooperationen

Die Methodik zur Genotypisierung der Probanden hinsichtlich *GSTT1* wurde in Anlehnung an Pemble *et al.* (1992) von Herrn Dr. med. R. Kerb entwickelt und von ihm sowie weiteren Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Charité der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

Die Genotypisierung der Probanden hinsichtlich *NAT1* wurde von den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Charité unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi durchgeführt.

Die Phosphonsäurediester des Glutathions wurden von Herrn Dr. rer. nat. Thomas Kunze synthetisiert und für vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. H.-H. Borchert für die Schaffung der Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin durchführen zu können. Seine Unterstützung und besonders seine ständige Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. med. I. Roots danke ich für die Schaffung der Voraussetzungen zur Kooperation mit den Kollegen des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin. Allen Kollegen dieses Instituts sei Dank für die sehr angenehme, produktive Zusammenarbeit sowie die zahlreichen Blutspenden.

Herrn Prof. Dr. med. J. Brockmöller danke ich herzlich für die engagierte Betreuung dieser Arbeit, für seine Motivation, hilfreiche Kritik und die produktiven Diskussionen.

Frau U. Muschick danke ich für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bei der Phänotypisierung der Probanden hinsichtlich GSTT1-1 sowie ihre ständige Bereitschaft zur Hilfe bei vielen täglichen labortechnischen Arbeiten.

Frau B. Eyrich und Frau J. Peter sei Dank für ihre Mithilfe bei der Etablierung und Validierung der Nash- und HPLC-Methoden.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. H. Brosig für die Synthese der Vergleichssubstanz 2,4-Dinitrophenylhydrazon. Allen anderen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Pharmazie danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre.

Franz danke ich für seine liebevolle Unterstützung, hilfreiche Kritik und außerordentliche Geduld.

Publikationsliste

Bruhn, C., Brockmöller, J., Kerb, R., Roots, I. and Borchert, H.-H.: Concordance between enzyme activity and genotype of glutathione S-transferase Theta (GSTT1). *Biochem Pharmacol* 56 (1998), S. 1189-1193.

Bruhn, C., Brockmöller, J., Cascorbi, I., Roots, I. and Borchert, H.-H.: Correlation between Genotype and Phenotype of the human arylamine *N*-acetyltransferase type 1 (NAT1). *Biochem Pharmacol*, 58 (1999), S. 1759-1764.

Sprenger, R., Schlagenhauser, R., Kerb, R., Brockmöller, J., Bruhn, C. Roots, I. and Brinkmann, U.: Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics* 10 (2000), S. 557-565.

Brockmöller, J., Bruhn, C., Cascorbi, I., Borchert, H.-H. and Roots, I.: Functional effects of polymorphisms in the *NAT1* gene in humans. *Archives of Pharmacology*, Vol. 359, Nr. 3, Suppl. 1999.

Bruhn, C., Brockmöller, J., Kerb, R., Roots, I. and Borchert, H.-H.: Genotyping and phenotyping assays of glutathione S-transferase Theta (GSTT1). Vortrag auf dem European Graduate Student Meeting 20.-22.2.1998 in Frankfurt/Main. Abstract in *Pharmazie*, Vol. 53 Suppl. 1, März 1998.

Bruhn, C., Brockmöller, J., Borchert, H.-H.: Untersuchungen zum Polymorphismus der humanen *N*-Acetyltransferase 1 (NAT1). Poster auf der Veranstaltung „Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor“ der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., Landesgruppe Berlin-Brandenburg, am 29.6.1998 in Berlin.

Bruhn, C., Brockmöller, J., Cascorbi, I., Roots, I. and Borchert, H.-H.: Comparative phenotyping and genotyping studies of the human arylamine *N*-acetyltransferase type 1 (NAT1). Poster auf der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., 6.-8.11.1998 in Tübingen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 11. Oktober 2000

.....